المدخل إلى

علم الأحياء الدقيقة التشخيصي

An Introduction To Diagnostic Microbiology





تأليف

إبراهيم علي الطيار

التدقيق اللغوي

أ. علي محمود الطيار

الطبعة الأولى

2003م - 1423هـ



دار صفاء للنشر والتوزيع - عمان



﴿ وَقُلِ ٱعْمَلُوا فَسَيَرَى ٱللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَٱلْمُؤْمِنُونَ ﴾

صدق الله العظيم

المدخل إلى

علم الأحياء الدقيقة التشخيصي

An Introduction To

Diagnostic Microbiology

رقم الايداع لدى دائرة المكتبة الوطنية (2002/10/2472)

576
طي
الطيار، إبراهيم علي
المدخـل علـم الأحيـاء الدقيقـة التشـخيصي - An Introduction to Diagnostic Microbiology / إبراهيـم علي الطيار- عمان : دار صفاء للنشر ، 2002
( ) ص
ر . أ (2002/10/2472)
الواصفـات: /المختـبرات// التحليـل المخـبري// علـم الأحياء الدقيقة/

* - تم اعداد بيانات الفهرسة الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

الطبعة الأولى

2003 م - 1423 هـ



دار صفـــاء للنشر والتوزيع

عمان - شارع السلط - مجمع الفحيص التجاري - هاتف وفاكس4612190

ص.ب 922762 عمان - الاردن

DAR SAFA Publishing - Distributing

Telefax: 4612190 P.O.Box: 922762 Amman - Jordan

http://www.darsafa.com
E-mail :safa@darsafa.com

ISBN - 9957 - 24 - 073 - 0 ردمك

المقدمـــة

إن الزيادة السريعة في المعرفة الانسـانية أدت إلى إتسـاع وتفـرع العديـد مـن العلوم وظهور علوم أخرى، وكغيره من العلوم تفرع علم الأحياء وظهر فرع العلوم الطبية المخبرية الذي ينضوي تحته العديد من العلوم الخاصـة بالتشـخيص المخـبري للأمرض البشرية، ومع التقدم المتزايد علمياً أصبحت العلوم الطبية المخبرية مجتمعةً علماً منفرداً له خصوصيته وأهدافه،وما علم الأحياء الدقيقة التشخيصي سوى أحـد فـروع العلـوم المخبريـة ذي الأهميـة الكـبرى في تشـخيص مسـببات الألتـهابات وأنواعها للوصول الى العلاج المناسب للمرض الجرثومي.

ويعتمد هذا العلم بالأساس على علم الأحياء الدقيقة الطبي كقـاعدة لـه، إلا أن الأول يتميز بتخصصه في تشخيص مسببات الألتهابات إبتداءً من كيفية الحصول على العينة من المريض وحتى الوصول إلى المسبب وإيجاد العلاج المناسب له أيضاً.

ولأهمية هذا العلم لطلبة تخصص المختـبرات الطبيـة كـأحد العلـوم الطبيـة المساندة، ونظراً لندرة المراجع التي تتناول هذا الموضوع باللغة العربية تم وضـع هـذا الكتاب ليشمل أهم مواضيع علم الأحياء الدقيقة التشخيصي، ويغطي خطة جامعـة البلقاء التطبيقية الخاصة بهذا الموضوع ويقـدم مـادةً علميـة ُبسـيطةً ومفيـدةً لطلبـة المختـبرات الطبية في كلياتـنا الجامعية المتوسطـة، راجياً من الله أن أكون قـد وفقـت في ذلك .

والله ولي التوفيق

المؤلف

2002/10/1

المحتوى

الموضوع **الصفحة**

الوحدة الأولى

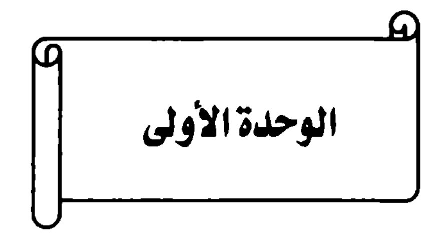
العينات

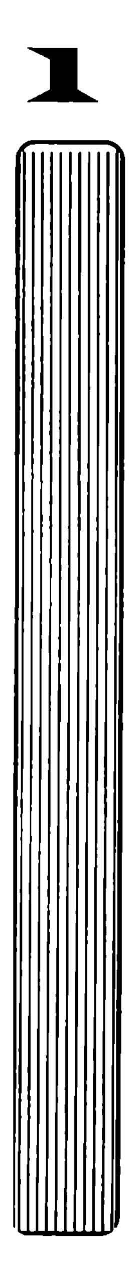
الوحدة الثانية

دراسة العينات المرضية

الوحدة الثالثة

الملاحق





العينات

The Specimens

الوحدة الأولى

The specimens العينات

مقدمة :-

علم التشخيص Diagnosis هو أحد فروع علم الأحياء الدقيقة ويعرف على أنه:

مجموعة الطرق المستخدمة في التعرف على الكائن الحي الدقيق الموجود في العينة أو المسبب للمرض .من حيث اختيار العينة وطرق عزل الكائن الدقيق الموجود فيها أو المسبب للمرض ودراسة الخواص الشكلية و التركيبية المميزة له.

ونتيجة للتعدد الكبير في أنواع الكائنات الحية الدقيقة من بكتيريا و فيروسات وفطريات وغيرها ، واختلاف صفاتها كان من الصعب التمييز بينها ولكن منذ اكتشاف المجهر الضوئي على يد العالم الهولندي لو فينهوك Leeuwen hook تم إثبات وجود الكائنات الحية الدقيقة في البيئات المختلفة .

وتبع ذلك جهود عدة علماء أهمهم روبرت كوخ R.koch الذي اكتشف علاقة البكتيريا بالمرض وقام بإيجاد تقنية الحصول على مزارع نقية للبكتيرياPure culture، ثم تظافرت جهود العلماء ليتم الكشف عن أنواع كثيرة جداً من الأحياء الدقيقة المرضة وغير المرضة ودراسة صفاتها وأشكالها .

وتطور تبعا لذلك علم التشخيص الذي اصبح علماً منفصلاً عن باقي فروع علم الأحياء بحيث ظهرت تقنيات عدة ومتطورة تؤدي إلى التمييز الدقيق بين كل نوع وآخر من أنواع الأحياء الدقيقة اعتماداً على صفات ذلك الكائن المكتشفة أصلاً.

وقد اصبح بالإمكان التمييز بين الأنواع المرضية Pathogenic وغير المرضية Non Pathogenic و الانتهازية Opportunistic واصبح من السهل تمييز الساكن

الطبيعي Normal flora في الجسم عن الأنواع الطارئة علية و التي قد تكـون سـبباً لحالة مرضية معينة .

وتتم عملية التشخيص في مختبر الأحياء الدقيقة الذي يجـب أن يكـون مـزوداً بالتجهيزات اللازمة لهذه العملية وتتوفر فيه مقومات السلامة العامة لتلافي العدوى وانتقـال الأمـراض كمـا يجـب أن يكـون الفـني أو الشـخص الـذي يقـوم بعمليـة التشخيص ذا كفاءة عالية ومعلومات غنية تمكنه من القيام بعملية التشخيص بجـودة عالية وشكل جيد.

الباب الأول

إجراءات السلامة العامة في مختبر الأحياء الدقيقة

Microbiological Lab. safety

قبل دراسة طرق تشخيص الأحياء الدقيقة يجب التعرف إلى بعض إجراءات السلامة العامة اللازم اتباعها في مختبر الأحياء الدقيقة .وذلك لمنع انتقال العدوى إلى العاملين أو إلى البيئة المحيطة وأهم هذه الإجراءات هي:.

1. يمنع تناول أو حفظ الطعام أو الشراب أو التدخين داخل المختبر .
2. لمنع تلوث الملابس يجب ارتداء Lab .coat وإغلاقه واستخدام القفازات المطاطية عند العمل .
3. غسل اليدين بالماء و الصابون وتعقيمها بالكحول بشكل مستمر .
4. عدم لمس العيون أو الفم أو الأنف أثناء العمل .
5. قبل البدء بالعمل يجب أن يتم تعقيم مكان العمل بالكحول 70% ويفضل القيام بعملية الزراعة في خزانة السلامة safety cabinate لتلافي التلوث .Contamination
6. المحافظة على مكان العمل نظيفا و معقما وتجنب ازدحامه بالعينات و الأجهزة.
7. اخذ الحذر عند التعامل مع العينات المرضية أو الأدوات الحادة مثل الإبر والسرنج والواخزة Lancet.
8. يجب المحافظة على الأوعية المحتوية على العينات مغلقة بشكل جيد وعدم فتحها إلا في حيز معقم أو بجانب لهب.
9. وضع المواد الملوثة أو المزارع القديمة في أوعية خاصة تمهيداً للتخلص منها وإتلافها في جهاز Autoclave.

10. التعقيم المباشر للأدوات المخبريه المستخدمة قبل وبعد كل استعمال مثلاً تعقيم Loop باللهب وتعقيم الماصات بالكحول أو محلول هيبوكلورات الصوديوم 10% Na - hypochlorite.

11. يجب عدم استخدام الماصات Pipettes الفموية لنقل المزارع البكتيرية وفي حالة عدم توفر الماصات الأتوماتيكية Automatic pipettes يستحسن وضع كمية من القطن في النهاية العريضة للماصة قبل استخدامها .

12. عند حدوث تلوث للملابس أو الجلد أو أسطح العمل بالبكتيريا أو العينات المرضية يستخدم الكحول 70% أو محلول 10% هيبوكلورات الصوديوم للتعقيم المباشر .

13. تحصين أجسام العاملين في مختبرات الأحياء الدقيقة بالمطاعيم اللازمة مثل مطعوم التهاب الكبد الفيروسي Hepatitis B.virus أو مطعوم الايدز AIDS أو مطعوم السل T.B لتلافي انتقال العدوى لهم.

14. المحافظة علي ظروف التعقيم بشكل عام ومستمر عند التعامل مع أية عينة مرضية أو مزرعة جرثومية .

15. في حالة حصول حادث في المختبر أو سقوط المزارع الحية أو العينات المرضية يجب اتباع ما يلي:

أ) إخبار مشرف المختبر بسرعة عن الحادث.

ب) وضع منشفة ورقية فوق المادة المسكوبة .

ج) سكب أي مادة مطهرة Disifectant بكمية كافية فوق المنشفة الورقية .

د) رفع المنشفة بعد مرور حوالي 15 دقيقة وإتلافها بشكل جيد.

16. يجب التعامل مع العينات المرسلة إلى مختبر الأحياء الدقيقة على أنها عينات مرضية من المفروض الحذر واتباع الإجراءات السليمة في التعامل معها ومراعاة ظروف التعقيم و السلامة في كافة مراحل العمل من اجل منع التلوث وانتقال العدوى و الخروج بنتائج سليمة وصحيحة بعد إجراء الفحوصات اللازمة على العينة .

الباب الثاني

الطرق العامة في التشخيص المخبري للأحياء الدقيقة

Laboratory Diagnosis of microorganisms

يتمثل التشخيص بعدة خطوات متسلسلة يعطي كل منها دليلاً معيناً على وجود الكائن من اجل الوصول إلى تحديد العامل المسبب للمرض والمساعدة في إعطاء العلاج اللازم لذلك ،ويعتمد التشخيص بشكل أساسي على التعرف إلى:

1- شكل الكائن الحي الدقيق وصفاته التركيبية .

2- شكل النمو (المزرعة) وصفاته.

3- التفاعلات البيوكيميائية والمصلية .

وتقسم طرق تشخيص الأحياء الدقيقة بشكل عام إلى أربع مراحل هامة وهي:

المرحلة الأولى:. الفحص المجهري للعينة المرضية

Microscopic examination of patient specimens:

حيث تعطي هذه المرحلة معلومات مهمة ومفيدة خلال أربع ساعات من وصول العينة إلى المختبر إذ يتم هنا التعرف إلى شكل الكائن الدقيق وبعض صفاته وتتمثل هذه المرحلة بعدة خطوات وتقنيات مهمة يفيد كل منها لتشخيص نوع أو اكثر من الأحياء الدقيقة وهي كما يلي:

1-الفحص المباشر للعينة Direct examination،

ويتم ذلك إما بالتحضير الرطب Wet mount لمشاهدة الكائن المسبب وبعض الدلائل الأخرى على الالتهاب مثل الخلايا القيحية Pus cells مثلاً أو بتقنية القطرة المعلقة Hanging drop Technique حيث يتم تمييز البكتيريا المتحركة عن غير المتحركة في العينة.

2- تقنية الصبغ Staining :

تتميز هذه الطريقة بأنها سريعة وسهلة العمل وتتلخص بوضع العينة على شريحة زجاجية وتجفيفها ثم إجراء خطوات الصبغ عليها ومن ثم مشاهدتها تحت المجهر ،و تعتبر هذه التقنية مفيدة فيما يلي:.

1- التعرف على شكل الكائن الحي الدقيق.

2- التعرف على تركيب الكائن الحي الدقيق.

3-التعرف على تفاعله مع صبغة غرام (موجب أو سالب لصبغة غرام).

واكثر الصبغات شيوعاً في العالم هي :.

أ- الصبغات الشائعة Common stains : والتي تقسم إلى صبغات بسيطة وصبغات مركبة ومن الأمثلة على الصبغات شائعة الاستخدام ما يلي:.

صبغة غرام Gram stain و صبغة اليود Iodine stain

وصبغة Acid –fast stains و وصبغة جسما Giemsa stain

2-الصبغات التألقية Fluorescent dyes (fluorochromes) :

تعطى هذه الصبغات مظهراً متألقاً للكائن الحي مع خلفية مظلمة عند الفحص بالمجهر التألقي Fluorscent microscope بعد تحضير مسحة من العينة مباشرة وصبغها بالصبغات التألقية . وتعتبر هذه التقنية مفيدة للتعرف السريع على الفطريات أو البكتيريا الموجودة في العينة المرضية و تميز الكائن الحي الدقيق عن خلايا الجسم و البقايا العضوية الأخرى .

واهم الصبغات التألقية المستخدمة هي:

أ - صبغة Acridine orange التي ترتبط مع الحامض النووي للبكتيريا و الفطريات.

ب- صبغة Auramine rhodamine التي ترتبط مع الحامض Mycolic acid الموجود في الجدار الخلوي لبكتيريا Mycobacterium .

ج- صبغة Calcoflour white ترتبط مع السليلوز المكون لجدار خلية الفطريات .

3- فحوصات الحقل المظلم Dark Field Examination :

تستخدم هذه التقنية للكشف عن اللولبيات Spirochetes حيث يستعمل هنا مكثف Condenser خاص يوجه الضوء على العينة من زوايا مائلة جدا بحيث لا ينفذ الضوء مباشرة من خلال العينة و إنما تنعكس الأشعة الضوئية عنها لذلك فالضوء المنعكس عن العينة هو الضوء الوحيد المنتقل إلى الأعلى نحو الجهر .

وإذا ما نظم الضوء جيدا فان العينة تظهر بوضوح و لمعان على أرضية معتمة كما و يمكن استعمال هذه الطريقة مع الأشعة فوق البنفسجية ultraviolet .

4- الفحوصات التألقية المناعية المباشرة Direct Immunofluorescence assay

تستخدم هذه الطريقة بشكل شائع للكشف عن بكتيريا Legionella Pneumophila و Bordetella Pretussis في عينات الجهاز التنفسي و الكلاميديا chlamydia Trachomatis في عينات ملتحمة العين و الجهاز التناسلي و تستخدم أيضا للكشف عن الفيروسات المختلفة .

و تتلخص آلية هذه التقنية في إلصاق أصباغ متألقة مثل الفلورسين Fluorescein مع أجسام مضادة Antibody دون أن تؤثر الصبغة على قابلية الأجسام المضادة في التفاعل مع الانتجينات Antigene و إذا ما التصق جسم مضاد معالج بصبغة الفلورسين Fluorescein مع انتجين معين خاص على سطح الجرثومة . فان الفلورسين سيرتبط بسطح الجرثومة ويظهر على الكائن الحي بشكل حدود لامعة عند فحصه بالأشعة فوق البنفسجية (U.V) و يمكن بمساعدة هذه التقنية تحديد الأنواع المصلية Serotypes المتباينة للجراثيم عند الفحص المباشر للعينات .

المرحلة الثانية :. الكشف عن جزيئات خاصة بالكائن المسبب للمرض

Detaction of Pathogen –specific macromolecules

أ- الكشف عن انتجينات البكتيريا Detaction of bacterial antigens :

و تتميز الطرق التالية بالسرعة و الدقة و السهولة اكثر من الطرق التألقية المناعية السابقة وهي :

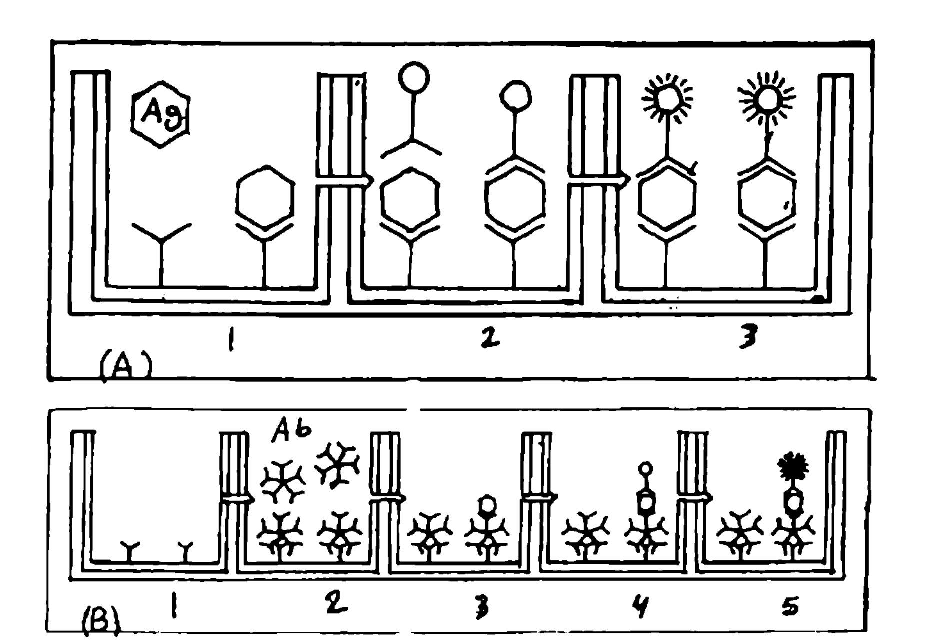
1- طرق الفحص المناعي الأنزيمي (EIA) Enzyme Immunoassay :

إن معظم طرق (EIA) تستخدم أجساما مضادة مرتبطة مع سطح صلب (مثل الأغشية و الأطباق الرقيقة Microtiter plate) لأجراء التجربة من اجل الارتباط بالانتجين (Ag) في العينات السائلة إذ أنة بعد ارتباط الأنتجين بالأجسام المضادة الموجودة والمحضرة يتم إضافة أجسام مضادة معلمة بالإنزيمات Enzyme-labeled antibody متخصصة إلى المزيج ثم يتم إضافة المادة الأساس substarate الخاصة بالإنزيم من اجل إعطاء تفاعل مرئي نتيجة لذلك، الذي يمكنه مشاهدته بأجهزة خاصة .

وتكون هذه العملية ناجحة في حال كون الجسم المضاد المحضر أصلا خاص بالانتجين المضاف و الذي يرتبط معه ولا يتم إزالته بعمليات الغسل المستمر .

بينما إذا كان الانتجين المضاف من نوع مغاير للجسم المضاد فان الانتجين لا يلتصق بالجسم المضاد وبالتالي يتم إزالته بعمليات الغسيل Washing وتكون النتيجة في هذه الحالة سلبية Negative .

ويمكن من خلال هذه الطريقة الكشف عن العديد من الجراثيم في العينات المباشرة .فمثلاً يمكن الكشف عن بكتريا Streptococcal Pharyngitis في مسحة swab مأخوذة من الحلق خلال 5-10 دقائق وتصل دقة وحساسية هذا الفحص إلى 95% في مجمل الحالات كذلك يمكن الكشف عن الكلاميديا C.trachomatis وسموم بكتيريا clostridium difficile والعديد من الفيروسات حيث يمكن الحصول على النتيجة في خلال عشر دقائق إلى ثلاث ساعات من بدء التجربة.



A- الكشف المباشر عن الانتجينات بطريقة ELISA .

1- إضافة العينة (مصل الدم) إلى أجسام مضادة خاصة ملتصقة بسطح صلب.

2- إضافة أجسام مضادة معلمة بالأنزيمات متخصصة بالانتجين المراد الكشف عنه.

3- إضافة المادة الأساس Substrate لينتج التفاعل اللوني.

B- الكشف عن الأجسام المضادة (IgM) بطريقة ELISA .

1- أجسام مضادة خاصة بالنوع IgM ملتصقة بسطح صلب.

2- إضافة العينة المحتوية على IgM.

3- إضافة الانتجينات الخاصة بهذا الجسم المضاد.

5+4 : كما في الخطوات (2+3) من الفرع (A).

2- طريقة التخثر Particle agglutination .

وتتلخص هذه الطريقة بتحضير جزيئات كبيرة Latex مغطلة بأجسام مضادة خاصة بنوع معين من الانتيجينات ثم خلطها مع العينة المحتوية على الانتجين وعند وجود الانتجين الخاص بالأجسام المضادة المحضرة فان النتيجة الإيجابية تكون على شكل تخثر agglutination وتجمع للمزيج على شكل حبيبات صغيرة والذي يطلق عليه ايضاً اسم latex agglutination .

إذ تكون المنطقة (FC) من الجسم المضاد IgG هي المربوطة مع الجزيئات الكبيرة latex أو مع بروتين A لبكتيريا Staphylococcus aureus بينما تكون المنطقة (Fab) حرة قادرة على الارتباط مع النوع الخاص بها من الانتيجينات .

ومن الأمثلة المهمة على هذا النوع من التقنية الطقم (Kit) المحضر الجاهز لتشخيص التهاب السحايا البكتيري حيث يحتوي هذا الطقم (Kit) على خمس عبوات كل واحدة تحتوي على أجسام مضادة خاصة بواحدة من الخمسة أنواع الشائعة للبكتيريا المسببة للسحايا بحيث تكون الأجسام المضادة ملتصقة على جزيئات Latex ويتم التفاعل بخلط نقطة واحدة من السائل النخاعي الشوكي CSF مع نقطة من كل عبوة ويكون حدوث التخثر بعد التحريك دليلاً على وجود انتجين البكتيريا في CSF وتستخدم هذه التقنية في كثير من الفحوصات مثل فحص CRP وفحص الروماتيزم RA-Latex وفحص ASOT وغيرها من فحوصات التخثر.

ب- الكشف عن تسلسل الحامض النووي Detection of nucleic acid sequences

1- فحص الاستدلال على الحامض النووي للكائن الدقيق :

Nucleic acid probe test :

تستخدم هذه التقنية للكشف السريع عن البكتيريا في العينات المرضية أو مزارع الأحياء الدقيقة التي يشكل عزلها عملية معقدة مثل بكتيريا السيلان Neisseria gonorrhoeae و C.trachomatis.

وتبنى هذه التقنية على إن أي نوع من DNA يحمل شيفرة لتسلسل معين من الجينات حيث يتم عزل DNA وتحطيمه على شكل خيط منفرد Single-strand ليستخدم في إنتاج DNA مكمل DNA (cDNA) Complementary الذي يستخدم كدليل Probe يتم الكشف من خلاله فيما بعد على rRNA في أية عينة تحتوي على نفس الكائن الحي الدقيق الذي اخذ منه DNA الأصلي .

يستخدم جهاز خاص للقيام بهذا الفحص بيد أن ارتفاع سعر الجهاز والمواد المستخدمة في الفحص تعتبر من سيئات هذه التقنية.

2- فحص PCR Polymerase chain reaction :

يستخدم هذا الفحص لتشخيص كثير من الأحياء الدقيقة في العينات المرضية ويعتمد على تكثير DNA الكائن الدقيق الموجودة في العينة المرضية من اجل إجراء الفحوصات اللازمة على DNA بسهولة .وتتلخص هذه التقنية بالخطوات التالية:.

أ-يتم عمل مزيج من المكونات التالية :.

1- ال DNA المراد التعرف علية.

2- جين بدء Primers قادر على الارتباط بشريط الDNA في نقطة معينة .

3-أنواع متعددة من النيوكلوتيدات Nucleotides.

4-أنزيم بلمرة مقاوم للحرارة .Taq polymerase.

إذا أنه من الضروري إضافة جينات البدء primers و النيوكلوتيدات بكميات كبيرة إلى المزيج.

ب- يوضع المزيج في جهاز حراري خاص Thermocycler مجهز لتغيير درجة الحرارة وتنظيم خطوات PCR الثلاث التالية.

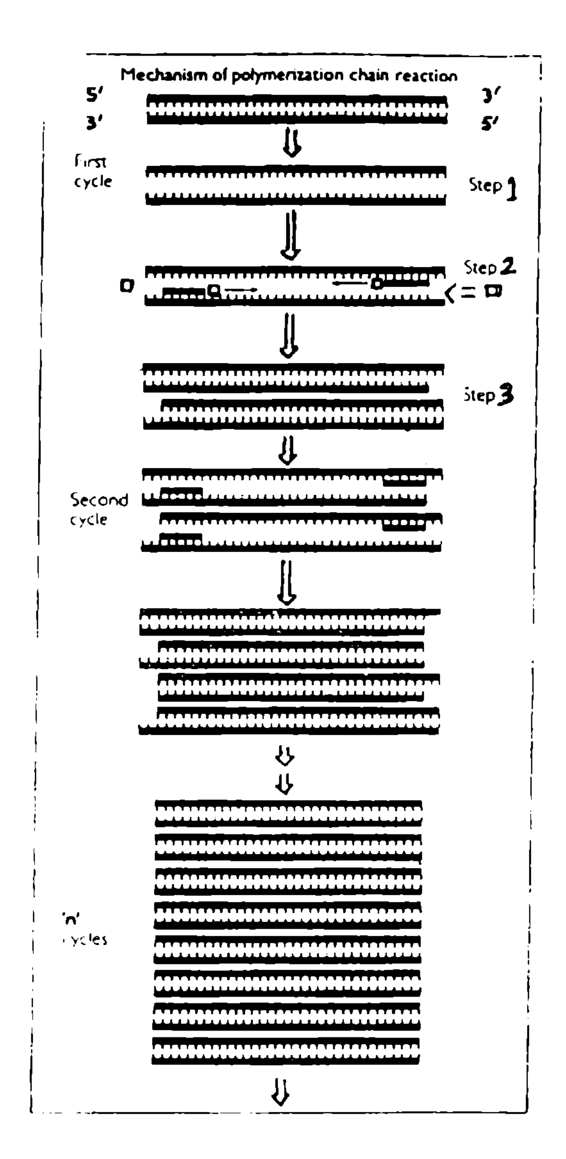
1- يتم فصل الـ DNA إلى شريط مفرد على درجة حرارة 90-95° م.

2- يبرد المزيج إلى درجة حرارة 50°م ليتم السماح لجين البدء بالارتباط في موقعه المخصص على شريط DNA من أجل بدء إنتاج سلسلة مكملة

لشريط الـ DNA الأصلي المفرد.

3- يتـم زيـادة درجـة الحـرارة إلى 72°م بحيـث يبـدأ أنزيـم البلمـرة Taq polymerase بإضافـة النيوكلوتيـدات إلى جـن لتكـون سلسـلة DNA مكملة ومقابلة للشريط الأصلي.

ج- تكرر هذه العملية لمرات متعددة لإنتاج ملايين النسخ من DNA الكائن الدقيق المراد تكثيره.



شكل مبسط لطريقة PCR

1- فصل سلسلتي الحامض النووي dsDNA.

2- إضافة النيوكلوتيدات وأنزيم البلمرة وجين البدء..

3- ترجمة DNA وإنتاج نسخ متعددة منه.

المرحلة الثالثة: زراعة وعزل الكائن الدقيق:

Cultural and Isolation of Microorganisms :

تعتبر عملية الزراعة من أهم الطرق المستخدمة لتشخيص الأحياء الدقيقة إذ يتم من خلالها تكثير الكائن الحي الموجود يفي العينة المرضية مما يسهل عزل ودراسة صفات هذا الكائن وتشكل مزارع الأحياء الدقيقة وسيلة مهمة تسهل وتعطي مجالاً واسعاً أمام الدارس لمتابعة الفحوصات على أي كائن حي دقيق ينمو في الأوساط الزراعية من حيث:

1- الصفات الشكلية للمستعمرات والنمو.

2- التفاعل مع الأجسام المضادة.

3- التفاعلات البيوكيميائية Biochemical test .

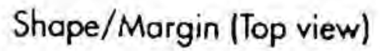
وتحتاج مزارع الأحياء الدقيقة لفترة زمنية من الحضانة على درجات حرارة مناسبة في الغالب تكون مقاربة لدرجة حرارة جسم الإنسان، وتتراوح الفترة الزمنية لحضانة المزارع من 18 ساعة إلى عدة أسابيع اعتماداً على نوع الكائن المراد الكشف عنه وسرعة انقسامه وطريقة تغذيته.

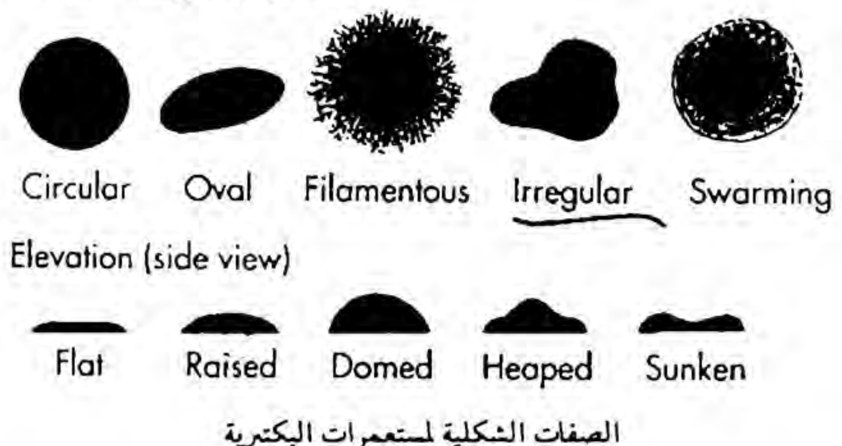
ويعتمد نجاح الكائن الحي في النمو على المزارع المحضرة على ما يلي:

1- طريقة جمع العينة من حيث مكان ووقت الجمع ومراعاة ظروف التعقيم أثناء ذلك.

2- اختيار الوسط الملائم للكائن المراد الكشف عنه مثلاً يوجد أوساط زراعية شاملة لتنمية عدة أنواع من البكتيريا مثل آجار الدم Blood agar و Chocolate agar بينما يوجد أنواع من الأوساط الزراعية خاصة بتنمية نوع أو أنواع قليلة من البكتيريا مثلاً وسط Lownstein - Jensen agar الخاص بتنمية بكتيريا السل Mycibactrtium tubetculosis ووسط MacConkey agar الخاص بتنمية الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام.

وفي الاتجاه الآخر هنالك أوساط زراعية خاصة لتنمية الفطريات مثل وسط SDA و أوساط خاصة لتنمية الفيروسات مثل المزارع التي تختلف في مكوناتها وصفات النمو على كل منها.





الصفات الشكلية لمستعمرات البكتيرية

المرحلة الرابعة: الفحوصات المصلية Serological test:

ترتكز هذه الفحوصات على أساس تفاعل الأجسام المضادة Antibody التي كونها الجسم نتيجة للاصابة بجرثومة معينة مع انتيجينات Antigene محضرة في المختبر وخاصة بالجرثومة نفسها، إذ ترتفع الأجسام المضادة في جسم الإنسان تدريجيا بعد الإصابة بأية جرثومة وتكون هذه الأجسام المضادة بالنوع المسبب فقط لذلك فإن الفحوصات المصلية مفيدة للتشخيص المبكر للاصابات الجرثومية بشكل عام. لذلك يكون استخدام الفحوصات المصلية خاصة ذا أهمية كبيرة في الحالات التالية:

أ- صعوبة عزل الكائن المسبب للمرض مثلاً كما في الإصابات الناتجة عن الفيروسات أو المايكوبلازما.

ب- عمق مكان الإصابة مثل التهاب الرئة Pneumonia والتهاب العظام Osteromylitis والتهاب الكبد.

جـ- تحديد مرحلة الإصابة والتمييز بين الإصابة الحالية والإصابة القديمة Post infection.

ومن الأفضل كقاعدة لنجاح الفحوصات المصلية في عملية التشخيص أن تأخذ عينتين من الدم الأولى خلال الطور الحاد للمرض Acute phase و الثانية بعد حوالي 2-3 أسابيع من الإصابة وذلك لزيادة فرص التشخيص السليم .

وتضم الفحوصات المصلية مجموعات متنوعة من الفحوصات منها .

1- فحوصات التخثر agglutination test : تستخدم هذه الفحوصات لتشخيص الحمى المالطية و التفوئيد وغيرها من الأمراض.

2-فحص تثبيت المكمل Complement fixation test : واكثر ما يستخدم هذا الفحص لتشخيص الإصابات الفطرية والفيروسية وحمى Q (Q fever) التي تسببها بكتيريا Coxiella burneti .

3- الفحوصات التألقية المناعية غيرالمباشرة Indirect immuno fluorscence tests : في هذه الطريقة تستخدم أجسام مضادة مرتبطة بمادة مشعة خاصة بنوع معين من الأجسام المضادة Anti-human antibody التي تتفاعل أصلا منع الأنتجينات وتستخدم هذه الفحوصات للكشف عن البكتيريا المسببة لمرض الزهري Treponemaو بكتيريا Borrelia و الركتسيا وغيرها من الأنواع.

الباب الثالث

القواعد العامة لجمع العينات

تعتمد نتائج المختبر التشخيصي بشكل كبير علـى نوعيـة العينـة و الوقـت وحالة المريض عند اخذ العينة و المواد المستخدمة وطريقة العمل بحيـث تكـون كـل السابقة مناسبة لحالة المريض ولنوعية المرض و الكائن المسـبب وتكـون ذات كفـاءة ودقة عالية .

ويعتبر جمع العينة المرضية أول واهم خطوة من خطوات تشخيص الإصابة و الكائن المسبب وذلك لان صحة الفحوصات التشخيصية للمرض و المسبب تعتمد بشكل أساسي على دقة عملية الجمع من حيث اختيار وقت وطريقة الجمع ومراعـاة حساسية الكائن المراد الكشف عنه لبعض المواد الكيميائية وأماكن وجوده أثناء فترة الإصابة .لان عزل الكائن المسبب حياً من الأمور المهمة جداً في عمليـة التشـخيص ومن الأمور المهمة أيضا أثناء جمع العينـة معرفـة السـاكن الطبيعـي Normal flora لمنطقة اخذ العينة حتى لا يختلط التشخيص بين الكائن المسبب للمرض و السـاكن الطبيعي لمكان أخذ العينة .

وتقع مسؤولية جمع العينة المرضية في الغالب على فني المختبر ولكن قـد تـتم هذه العملية في بعض الحالات خارج المختبر وهذا يستوجب التنسيق بين الطبيب و المرض و فني المختبر من اجل الحصول على عينة سليمة صالحة لعملية التشخيص.

أما نوع العينة فيعتمد على أمور عـدة منـها الحالـة المرضيـة ومرحلـة المـرض ونوع الكـائن المسـبب المـراد البحـث عنـه وتختلـف تبعـاً لذلـك أنـواع العينـات المستخدمة في تشخيص الألتـهابات فـهي قـد تكـون دم Blood أو بـول Urine أو بلغم Sputum أو براز Stool أو قيح pus ومن اجل جمع افضل عينة مرضية يجـب مراعاة الأمور التالية :

1- اختيار نوع العينة المراد جمعها بحيث تكون معبرة عن المرض ومفيدة في التشخيص وهذا يتطلب أموراً عدة منها :.

أ- معرفة جيدة بالحالة المرضية ومرحلة الإصابة ويكون ذلك بالتنسيق مع الطبيب فمثلاً يكون عدد الجراثيم كثيراً في المرحلة الحادة من الإصابة Acute phase ويكون عدد الجراثيم أيضا كبيراً في الإسهال اكثر من البراز الصلب أو اللين في حالات التهاب الأمعاء .

ب- المعرفة العامة بالكائن المتوقع عزله من اجل إعداد الأوساط وطرق العزل المناسبة له وكذلك من المفروض معرفة مكان وجود الكائن الدقيق في هذه المرحلة من الإصابة فمثلاً لتشخيص وعزل بكتيريا Salmonella المسببة للتيفوئيد تأخذ عينة البراز للزراعة بالفترة ما بين الأسبوع الثاني و الثالث من الإصابة.

ج- اخذ العينة المناسبة والصحيحة لتشخيص الحالة المرضية اعتماداً على الأعراض Symptoms و العلامات Signs ، مثلاً في حالة التهاب الرئة Pneumonia يتم أخذ عينة بلغم Sputum وليس اللعاب Saliva كذلك يجب اخذ المسحة Swab من عمق الجرح وليس من سطحه وفي حالة عدم وجود مكان مباشر لأخذ العينة يستعاض عن ذلك بزراعة الدم مثلاً أو بالفحوصات الأخرى كالفحوصات المصلية Serological test.

2- يجب أن تكون أوعية جمع العينات نظيفة ومعقمة ومحكمة الإغلاق ومميزة بمعلومات عن العينة و المريض .

3- يجب اخذ العينة من المريض قبل تناول المضادات الحيوية أو العوامل القاتلة للجراثيم Antimicrobial agants وفي حال تناول المريض لأي من المواد السابقة ،يجب التوقف عن أخذ العلاج و الانتظار مدة 3-5 أيام ثم أخذ العينة منه .

وفي حال كون زراعة العينة ضرورة مستعجلة في بعض الأوقات يتم اللجوء إلى إضافة مواد محللة للعلاجات مثل انزيم Penicillinase الذي يحطم البنسلين .

ويكون ذلك لأن تناول المضادات الحيوية يؤدي إلى اختفاء الجرثومة في العينة وإعطاء نتائج سلبية كاذبة فمثلاً لا تظهر الجراثيم في السائل النخاعي الشوكي CSF لمدة 24 ساعة بعد تناول المضادات الحيوية كما وتعطي زراعة البراز stool culture للكشف عن Salmonella نتيجة سلبية خلال 24 ساعة من تناول المضادات الحيوية أيضاً.

4- يجب تجنب التلوث الخارجي وذلك بمراعاة ظروف التعقيم كافة أثناء جمع أو حفظ أو نقل العينة كتعقيم الجلد الجيد قبل سحب الدم للزراعة مثلاً.

5- يجب أن تكون كمية العينة كافية ومناسبة للفحوصات المطلوبة .

6- عند توقع احتواء العينة على أعداد كبيرة من الساكن الطبيعي Normal flora يفضل وضع العينة في الثلاجة تحت درجة حرارة من 2-5مْ لعدة ساعات من اجل تقليل الساكن الطبيعي الموجودفيها .

7- عند توقع وجود جراثيم لاهوائية في العينة يجب اخذ العينة ووضعها في أوعية خاصة مفرغة من الهواء وحاوية على ثاني أوكسيد الكربون CO2 أو إضافة مواد مختزلة للأكسجين إلى العينة .

8- الإسراع في نقل العينة إلى المختبر في حالة جمعها خارجه.

٩- الإسراع في التعامل مع العينة من زراعة أو فحص أو حفظها في أوساط حفظ خاصة حتى يتم التعامل معها .فمثلاً يفضل فحص عينة إفرازات الاحليل للكشف عن جرثومة مرض السيلان N.gonorrhoeae مباشرة أو وضعها في وسط حافظ بسبب تلفها السريع و تأثرها بالبيئة المحيطة.

10- يجب أن تكون العينة مميزة برقم خاص أو باسم المريض ورقمه أن وجد ويكون نموذج طلب الفحص يحتوي على معلومات متعلقة بالمريض مثل الأسم والجنس والعمر ومعلومات متعلقة بالعينة مثل نوع العينة ومصدرها والفحص المطلوب ووقت أخذها.

11- يجب رفض العينة غير الصحيحة وغير المناسبة لشروط صحة الفحص مثل عدم توافق العينة مع المعلومات المدونة على الوعاء أو النموذج المرفق أو أن تكون جافة أو مفتوحة غير معقمة أو أية شروط تجعلها غير صالحة للفحص .

الباب الرابع

طرق حفظ العينات لحين زراعتها

كما أسلفنا سابقاً إن جمع العينة يعتبر الخطوة الأولى والمهمة في عملية التشخيص إلا أن هذا لا يقلل من قيمة الخطوات الأخرى في عملية التشخيص حيث تساعد هذه الخطوات مجتمعة في الوصول إلى نتائج سليمة وقيمة تؤدي في النهاية إلى تحديد الكائن المسبب للمرض ومن الخطوات المهمة التي تلي عملية جمع العينة هي عملية حفظ العينة حتى زراعتها ، إذ انه في بعض الحالات يتعذر التعامل المباشر والسريع مع العينة المرضية لأسباب قد تكون خارجة عن إرادة العامل في المختبر مثل عدم توفير المواد اللازمة للفحص أو الحاجة إلى نقلها إلى مختبر آخر مما يستوجب توفير ظروف ملائمة للعينة حتى تبقى العينة في حالتها الطبيعية ويبقى الكائن الحي الدقيق فيها حياً دون أن يتأثر بالظروف الخارجية وتستخدم في هذه الحالة أوساط زراعية خاصة من اجل حفظ أو نقل العينة maintenance or transport mediaحتى تتوفر الظروف الملائمة لزراعتها. وأوساط الحفظ أو النقل هي أوساط غذائية تساهم في بقاء الكائن الحي في حالته الطبيعية وحيويته لفترات زمنية طويلة إلا أنها لا توفر النمو المثالي الجيد للكائن الحي الدقيق فيها . وتختلف هذه الأوساط اعتماداً على نوع الكائن الحي المتوقع وجودة في العينة المرضية.

ومن البديهي أن الهدف الرئيسي لزراعة العينات المرضية هو تكثير الكائن الحي الدقيق المتوقع وجوده فيها من أجل دراسته و التعرف على صفاته وحتى يتم ذلك لابد من أن يبقى هذا الكائن حياً في العينة محافظاً على حيويته فيها حتى ولو تأخرت عملية الزراعة ولأجل الحصول على نتائج سليمة لعملية حفظ العينات ونقلها حتى زراعتها يفضل اتباع القواعد التالية:

1- يفضل زراعة العينة مباشرة بعد أخذها من المريض على الوسط المناسب وفي ظروف مناسبة وهذا يعتبر أفضل طريقة للحصول على نتائج سليمة وخاصة

لبعض العينات التي لا تتحمل البقاء لمدة زمنية طويلة في الظروف البيئية المحيطة مثل عينات CSF أو إفرازات الأحليل للبحث عن البكتيريا المسببة للسيلان.

2- إذا لم تتوفر الظروف المناسبة لزراعة العينة مباشرة فهنالك وقت مسموح به لبقاء الكائن الحي الدقيق حياً في العينة على درجة حرارة الغرفة فمثلاً يفضل زراعة عينة البول خلال ساعة من جمعها بينما عينة البراز تأخذ فترة أكثر بقليل من عينة البول .

3- توضع العينات في الثلاجة بين 2-8مْ للمحافظة على حياة الكائن الحي الدقيق فيها لفترة زمنية تتراوح 3-24 ساعة حيث يتم تثبيط نمو و تكاثر الأحياء الدقيقة فيها لحين زراعتها وتنقل هذه العينات إلى مختبرات أخرى في صندوق مبرد Cooling box على أن تكون عملية الزراعة والنقل ضمن الفترة الزمنية المسموح بها والمحددة أعلاه .

4- بعض العينات يفضل أن تبقى في درجة حرارة الغرفة ولا توضع في الثلاجة مثلاً لا ينصح بوضع عينات CSF و نخاع العظم Bone marrow و كشطات الجلد Skin scraping و الأظافر والشعر المستخدمة للكشف عن الفطريات الجلدية في الثلاجة ،وإنما تبقي على درجة حرارة الغرفة حتى تتم زراعتها .

5- يفضل حفظ المسحات Swabs في أوساط سائلة مثل Thyoglycollate broth أو غمسها في الآجار الصلب .

6- في حال صعوبة زراعة العينة خلال الوقت المناسب و اللازم لبقاء الكائن حياً فيها يفضل وضعها في أوساط حفظ ونقل خاصة بكل عينة حتى يتم زراعتها أو وصولها إلى المختبر الخاص وذلك للحفاظ على الجراثيم من الجفاف أو الأكسدة أو التحطيم الذاتي ومن اكثر أوساط النقل المستخدمة وسط Cary-Blair media ووسط Amies ووسط Sturat ووسط ماء البتون القاعدي Pepton water media.

7- أما العينات التي يتوقع وجود الفيروسات فيها فيتم حفظها في الثلج حتى تتم عملية الزراعة لها مع تجنب تجمدها على اكثر من -70مْ أو توضع في أوساط حفظ ونقل خاصة تحتوي على المضادات الحيوية لمنع تكاثر البكتيريا فيها .

الباب الخامس

الساكن الطبيعي في جسم الإنسان Normal flora

يعرف الساكن الطبيعي على انه مجموعة الأحياء الدقيقة التي تعيش بشكل طبيعي على جلد الإنسان أو غشائه المخاطي وفي مناطق مختلفة من الجسم وقد يبلغ عدد البكتيريا التي تعتبر ساكناً طبيعياً في جسم الإنسان حوالي (10^{14}) خلية بكتيرية. و تمثل البكتيريا الجزء الأكبر من الساكن الطبيعي في الجسم و يرافقها نسبة قليلة من الخمائر Yeast cell's مثل Candida spp أما الفيروسات و الطفيليات في الغالب فأنها كائنات مسببة للمرض إذا وجدت أي أنها من النادر أن تكون من الساكن الطبيعي في جسم الإنسان ويلعب هذا الساكن الطبيعي أدوارا عدة في جسم الإنسان منها :.

1- **مقاومة الإصابة** Infection resistance،

إن وجودها الساكن الطبيعي قد يساعد الجسم في مقاومة الإصابة بكثير من الأحياء الدقيقة المسببة للمرض من خلال منع ارتباط الكائن المسبب للمرض في مستقبلاته الموجودة على خلايا الجسم وإفراز بعض المواد التي تمنع حدوث المرض أو تقتل المسبب.

2- **تنشيط جهاز المناعة** Stimulation of the Immune system ،

تلعب معظم أنواع الساكن الطبيعي (ما عدا البكتيريا العصوية السالبة لصبغة غرام) دوراً مهما في حث مناعة الجسم وتنشيطها بسبب تشابه بعض انتيجيناتها مع بعض البكتيريا الممرضة.

3- **مصدر غذائي** Neutriant sorce ،

حيث تعمل على المساعدة في استخلاص وإنتاج بعض المواد الغذائية المفيدة للجسم مثل فيتامين K وتساعد أيضا بتصنيع مواد مساعدة لإنتاج بعض عوامل التخثر مثل العامل الثاني II و السابع VII و العاشر X .

4- تساعد على تنشيط تجديد الخلايا الطلائية الموجودة في جسم الإنسان وتلعب هذه

الكائنات التي تعيش كساكن طبيعي في جسم الإنسان دوراً في إحداث بعض الأمراض للجسم وذلك من خلال ما يلي :.

أ- الإصابة الانتهازية Opportunistic infection :

إذ يعمل الساكن الطبيعي في بعض الحالات بشكل انتهازي ليحدث للجسم أمراضاً متعددة خاصة في حالات تدني المناعة الناتجة من أمراض مثل مرض AIDS أو تناول جرعات عالية من المضادات الحيوية أو لأي سبب قد يؤدي الى انخفاض مناعة الجسم .

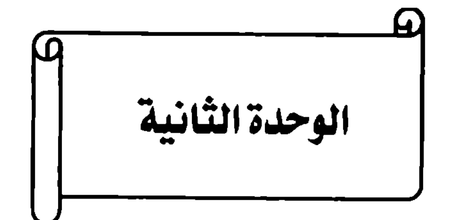
ب-دخول الأنسجة Tissue invasion :

يحدث في بعض الأوقات اختراق الساكن الطبيعي للأنسجة الموجودة في مكانه الطبيعي نتيجة لحادث ما أو لتوفر الظروف المناسبة مثلاً عندما يدخل الساكن الطبيعي للجلد عن طريق الجروح فأنه يسبب التهاباً موضعياً للجرح.

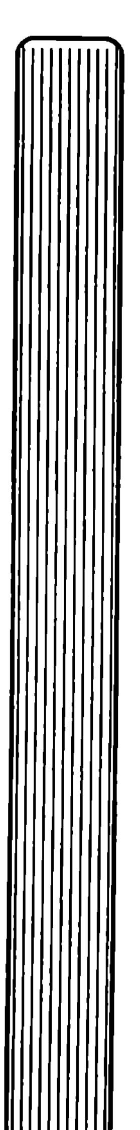
ج-الانتقال من مكان إلى آخر في الجسم :

حيث ينتقل الساكن الطبيعي من موقعه الأصلي إلى أماكن مختلفة من الجسم عبر الدم أو اللمف أو بشكل خارجي فيسبب فيها إصابات مختلفة مثلاً تعتبر بكتيريا E.coli ساكناً طبيعياً في أمعاء الإنسان وعند انتقالها بأي الطرق إلى القناة البولية فإنها تسبب لها الالتهاب وتعتبر E.coli من اكثر مسببات التهابات المسالك البولية.

ويتوزع الساكن الطبيعي في جسم الإنسان بنسب و أنواع مختلفة حسب منطقة وجوده فمثلاً يوجد في الجلد حوالي 10^4-10^5 كائن دقيق لكل سنتيمتر مربع واحد أغلبها من بكتيريا Staphylococcus epidermidis التي توجد في حوالي 85-100٪ من الأشخاص الطبيعيين بينما تمثل E.coli أعلى نسبة بين أنواع الساكن الطبيعي في أمعاء الإنسان ويعتمد وجود الساكن الطبيعي على توفر الظروف الملائمة له فهو يكثر على الجلد مثلاً في المناطق الرطبة و المتسخة بينما تكثر الأنواع اللاهوائية مثلاً في القناة الهضمية .







دراسات العينات المرضية

دراسة العينات المرضية

إن علم التشخيص كغيره من العلوم يتضمن علة خطوات متسلسلة ومرتبة تؤدي إلى الحصول على النتائج المطلوبة إذ يبدأ من جمع العينة إلى تشخيص الكائن المسبب للمرض ولكل خطوة أهميتها للحصول على نتائج سليمة وصحيحة يلزمها الدقة والتمكن في الجانب العملي والنظري ، فطريقة اختيار العينة و الوقت والمكان وكيفية اخذ العينة وتناسب ذلك مع الحالة المرضية والكائن المتوقع وجودة بالإضافة إلى الدقة المتناهية في العمل جميعها عناصر مهمة في عملية التشخيص وبما أن العمل التشخيصي يتعرض إلى تداخلات عدة من تلوث وأخطاء ذاتية وغير ذاتية وعوامل أخرى قد تقلل من دقة عملية التشخيص أو تحولها في اتجاه آخر فلا بد من توخي الدقة المتناهية في كل الخطوات أثناء العمل .

وسنفرد لاحقاً تفصيلاً يخص كل عينة مرضية وحدها من حيث طريقة جمعها و الكائنات الحية الدقيقة المتوقع وجودها فيها وطريقة تشخيص كل منها .

الباب الأول

التهابات المسالك البولية

Urinary Tract infection (UTI)

(عينة البول Urine)

مقدمة:

يعرف البول على انه سائل اصفر اللون حامضي معقم وخالي من الجراثيم في الوضع الطبيعي مكون من حوالي 96% ماء و 4% مواد صلبة ذائبة ذو كثافة نوعية بين 1.015 و 1.020 والرقم الهيدروجيني PH بين 6.5 - 7.5 و تختلف كميته اعتمادا على عوامل عدة في الجسم و ينتج من الجهاز البولي الذي يتكون في الإنسان من الكليتين و الحالبين و المثانة و الاحليل إذ يتعرض هذا الجهاز إلى التهابات متعددة تحدثها الأحياء الدقيقة وتعتبر التهابات القناة البولية Urinary tract (UTI) infection من اكثر الالتهابات شيوعاً في جسم الإنسان إذ تسمى الالتهابات التي تحدث اسفل الجهاز البولي وتشمل المثانة (bladder) ب Cystitis و تسمى التهابات الإحليل تسمى Urethritis أما التهابات أعلى الجهاز البولي و التي تشمل الكلى فتسمي Pyelonephritis.

ويعتبر التهابات اسفل الجهاز البولي من أكثر هذه الالتهابات شيوعاً إذ إن النوعين الآخرين هما مضاعفات للنوع الأول.

وتعتبر النساء اكثر عرضة للإصابة بالتهابات القناة البولية بثلاثين مرة من الرجال وذلك لأسباب تشريحية خاصة وتزداد احتمالية حدوث الإصابة مع تقدم العمر إذ أظهرت الدراسات أن 10% من النساء اللواتي تزيد أعمارهن عن 60 عاماً مصابات بالتهاب القناة البولية بينما عدد المصابين من الذكور والذين تزيد

أعمارهم عن 60 عاماً هو d% فقط .وتعود اغلب التهابات القناة البولية للأسباب التالية :-

1- تلوث فتحة البول بالجراثيم الموجودة كساكن طبيعي في الأمعاء Fecal Normal flora أو الموجودة كساكن طبيعي على الجلد Skin Normal flora بحيث ترتد الجرثومة إلى الخلف باتجاه القناة البولية لتحدث الالتهاب.

2- الاختلالات التشريحية Anatomic abnormalities للقناة البولية و التي تؤدي خاصة لانسداد مجرى البول أو ارتداد وعدم طرح البول كاملاً خارج الجسم .

3- العوامل الميكانيكية Mechanical Factors وهي العوامل التي تتضمن نقل الجراثيم إلى القناة البولية بصورة إجبارية مثل :-

أ- أنبوب القسطرة Catheters أو المسحات Swabs .

ب- المعاشرة الجنسية : إذ تكون المرأة المتزوجة و الحامل اكثر عرضة للإصابة من غيرها بالتهابات المسالك البولية .

ج- حصى الكلى Kidney stones وهي قد تؤدي إلى انسداد جزئي لمجرى البول أو إحداث جروح أثناء نزولها من القناة البولية و بالتالي فتح المجال أمام حدوث الالتهاب بسهولة .

4- العوامل الايضية Metabolic Factors : مثل الإصابة بمرض السكري و الذي يؤدي إلى زيادة كمية السكر في البول مما يوفر بيئة مناسبة لنمو الجراثيم و تكاثرها حيث تزداد احتمالية الإصابة بالتهابات القناة البولية عند الأشخاص المصابين بالسكري اكثر بثلاثين مرة من الأشخاص السليمين . كذلك فإن بعض الاختلالات التي تؤدي إلى تكون حصى الكلى والتي تزيد بدورها من احتمالية حدوث التهابات القناة البولية

5-إصابات المستشفيات Hospital infection : يتعرض كثير من المرضى في المستشفيات إلى التهابات القناة البولية بواسطة جراثيم ذات مناعة متطورة للمضادات الحيوي وخاصة عند إجراء عملية القسطرة البولية Urethral

أو اخذ مسحات من القناة البولية أو عند إجراء عملية بزل catheterization البول من المثانة Aspiration بواسطة أدوات قليلة التعقيم .

ويسبب نوع واحد من الجراثيم في الغالب التهابات القناة البولية إلا أنه في بعض الحالات قد يكون المسبب عدة أنواع من الجراثيم وهذه حالة نادرة جداً وهنالك أعراض سريريه ومخبريه قد تساعد في تشخيص التهابات القناة البولية مثل:-

أ- ترتبط التهابات اسفل الجهاز البولي Cystitis بالأعراض التالية:

1- البول المتكرر Frequency

2- عدم القدرة على التبول dysuria أو وجود ألم عند التبول .

3- نزول الدم مع البول Haematuria .

ب- وترتبط التهابات أعلى الجهاز البولي Pyelonephritis بالاعراض التالية :.

1- القشعريرة Chills .

2- الحمى Fever .

3- حرقة وألم عند التبول على جانبي الجسم وقد ينزل إلى الأسفل باتجاه العانة .

ج- وتظهر أعراض مشتركة مثل ظهور الخلايا القيحية Pus cell مع البول Pyuria و كذلك البكتيريا Bacteriuria .

ولتشخيص التهابات القناة البولية يعتبر البول من أهم العينات التي تأخذ لذلك فهو الوسط المهم للزراعة ودراسة المسببات المحتملة للالتهابات وإعطاء صورة عامة عن الجهاز البولي ويكون البول في العادة سائلاً معقماً sterile خالياً من الجراثيم وقد يتلوث البول أثناء نزوله من الجسم ببعض الجراثيم التي تعتبر ساكناً طبيعياً في الاحليل وخاصة الكميات الأولى من البول التي قد تحتوى على (10^1-10^3) من الجراثيم لكل ملليتر واحد من البول وقد يدل وظهور أحد أفراد البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae في أول دفعة من البول على وجود الالتهاب أو تلوث

العينة Contamination ولذلك يتم اللجوء إلى عد البكتيريا في العينة من اجل تميز البكتيريا الناتجة من الإصابة عن البكتيريا الناتجة من تلوث العينة .

ولقد أكدت العديد من الدراسات وخاصة التي قام بها العلماء مثل Kass و Sanford وغيرهم ، إن عينة البول إذا احتوى كل ملليتر واحد منها على عدد من البكتيريا اكثر من 100,000 (10^5/ml) جرثومة أو ما يسمى وحدة تكوين المستعمرة Colonies forming unite (CFU/ml) فان ذلك دليل مهم على وجود الالتهاب البكتيري .

أما إذا كان العدد اقل من (10^5 CFU/ml) فان ذلك ليس دلالة أكيدة على وجود الالتهاب حيث إن البول الطبيعي قد يحتوي على عدد من الجراثيم الناتجة من تلوث العينة إلا انه في بعض الحالات قد يكون عدد البكتيريا في عينة البول اقل من (10^5 CFU/ml) ومع ذلك فان الالتهاب قد يكون موجوداً حقاً كما في الأشخاص الذين يتناولون بعض المضادات الحيوية و الأشخاص الذين تناولوا كميات كبيرة من السوائل التي أدت إلى تخفيف البول .

الجراثيم المحتمل وجودها في عينة البول

Pathogenic البكتيريا المرضة	Normal flora الساكن الطبيعي
Escherichia coli	Diphtheroids
Klebsilla	Lactobacilli
Enterobacter	Coag-Negative staphylococci
Serratia	Alpha-streptococci
Proteus spp	وأعداد قليلة من
Pseudomonas spp	Enterobacteriaceae
Streptococcus Faecalis	Yeast
Staphylococcus (aureus - Saprophyticus - epidermadis)	
Alcaligenes spp	
Candida albicans	
Gardenella	

	Beta-hemolytic Streptococci N.gonorrhoeae C.trachomatis Enterococcus Acinetobacter Mycobacterium spp T.vaginalis Schistosoma Salmonella Shigella

ويمكن تقسيم مسببات التهابات المسالك البولية إلى :

1- المسببات الشائعة :

أ) تعتبر مجموعة البكتريا المعوية Enterobacteriaceae من المسببات الشائعة لالتهابات المسالك البولية والتي تعتبر كساكن طبيعي في القناة الهضمية للإنسان وتسبب حوالي 80% من الحالات حيث تسبب بكتريا E . coli حوالي 50% - 85%من الحالات بينما تسبب بكتريا Klebsiella Pneumonia حوالي 8% - 13% وتعتبر Staph. Saprophyticas أيضاً من المسببات الشائعة لالتهابات المسالك البولية وخاصة عند النساء اليافعات كونها ساكناً طبيعياً على الجلد .

ب) البكتريا الانتهازية Opportunistic Bacteria: مثل Pseudomonas, Serratia, Proteus وتسبب هذه الأنواع معظم إصابات المستشفيات Nosocomial infectins حيث يعتقد أنها ذات قابلية لمقاومة العوامل القاتلة للجراثيم .

2- المسببات غير الشائعة :

أ- البكتريا مثل Staph.aureus , Lactobacilli .

ب- الفطريات مثل Candida .

ج- الفيروسات مثل Adenovirus type 2.

د- وباقي الأنواع المذكورة في الجدول السابق .

جمع العينات Collection of specimens:

تجمع عينة البول Urine لتشخيص التهابات القناة البولية في الإنسان ولكن قبل البدء بعملية الجمع يجب اتباع ما يلي :.

أ- على المريض الامتناع عن تناول المضادات الحيوية لفترة 4-5 أيام قبل إعطاء العينة وذلك لتجنب النتائج السلبية الخاطئة حيث أن تناول المضادات الحيوية ولو بكميات قليلة فأنها تمنع نمو البكتيريا على أطباق الزراعة .

ب- جمع البول في عبوة Steriel Container معقمة جيداً ومحكمة الإغلاق ومناسبة الحجم .

ج- تنبيه المريض إلى عدم فتح العبوة لفترة زمنية طويلة وعدم ملامسة الجوانب الداخلية للعبوة وإغلاقها مباشرة بعد وضع العينة فيها .

ويتم جمع البول من المريض بعدة طرق هي:.

ا- **تقنية البول الوسطي** Midstream-clean-catch techcnique .

وهي اكثر الطرق شيوعاً لجمع عينة البول إذ إنها طريقة سهلة وتقلل عملية تلوث العينة بالبكتيريا الموجودة في الاحليل Urethra والمهبل Vagina وتتلخص في طرح الكمية الأولى خارجاً ثم وضع الكمية التالية وسط البول Mid stream urine (MSU) في عبوة الجمع وطرح آخر البول خارج العبوة .

وتتم هذه العملية في الذكور بالطريقة التالية:.

1- غسل اليدين.

2- غسل مقدمة القضيب Penis بالصابون.

3- غسل القضيب بالماء المعقم .

4- طرح الكمية الأولى من البول في خارج العبوة .

5- وضع كمية من وسط البول Midstream urine في العبوة ثم وإغلاقها جيداً.

أما عند الإناث فيتم جمع العينة بالطريقة التالية:.

1- غسل اليدين.

2- مسح الفرج باسفنجة مغموسة بالصابون من الأمام إلى الخلف ثم التخلص من الاسفنجة .

3- تكرار العملية السابقة ثلاثة مرات .

4- غسل الفرج بالماء المعقم .

5- التخلص من الجزء الاول من البول .

6- وضع ما تبقى من البول في عبوة معقمة وإغلاقها جيداً .

ملاحظة: يفضل اخذ عينتين من البول في الإناث بواسطة طريقة(MSU) Midstream urine وذلك لإعطاء دقة في النتيجة تصل إلى 95% .

2- طريقة القسطرة Catheterization.

في بعض المرضى الموجودين في المستشفيات يتم إدخال أنبوب مطاطي يسمى Catheter إلى المثانة عبر الاحليل من اجل المساعدة في طرح البول خارج الجسم لتلافي حالات انحباس البول التي قد ينتج بعضها من التهابات المسالك البولية ويتم اخذ العينة عبر هذا الأنبوب Catheter بتعقيم الجزء الموجود خارج الجسم بالكحول وسحب البول منه بواسطة سرنج syring معقم ثم وضع البول في عبوة معقمة مباشرة وإغلاقها جيداً.

ومن الجدير بالذكر انه يجب عدم اخذ عينة البول من كيس جمع البول drainage bag المتصل بأنبوب القسطرة حيث إن عدد البكتيريا الموجودة في البول المتجمع في الكيس يكون قد ازداد وتضاعف أثناء فترة التجميع وذلك لان البول يعتبر وسطاً مناسباً لتكاثر البكتيريا .

ويفضل اخذ عينة البول في النساء بطريقة القسطرة تجنباً لتلوث العينة بالبكتيريا الطبيعية الموجودة في منطقة الاحليل والفرج . ويعتقد إن عملية القسطرة

كما أسلفنا أحد مسببات التهابات المسالك البولية في المستشفيات إذ ان عملية تركيب هذه الأنبوب قد تدخل معها بعض البكتيريا التي قد تكون سبباً في حدوث الالتهابات .

3-**طريقة السحب المباشر من المثانة البولية** Suprapubic Needle Aspiration .

يلجأ الأطباء في بعض الحالات إلى هذه الطريقة من اجل الحصول على عينة من البول الموجود في المثانة باستخدام إبرة معقمة تدخل مباشرة في الجلد بعد تعقيمه إلى المثانة ثم يتم سحب البول ووضعه في وعاء معقم وتستخدم هذه الطريقة عند الأطفال الذين يصعب اخذ عينة البول منهم بشكل طبيعي أو في النساء لتجنب تلوث العينة ببكتيريا الاحليل أو الفرج .

4- **يتم جمع البول عند الأطفال** infants غير القادرين على التحكم بعملية التبول لديهم بواسطة تثبيت كيس خاص على الفتحة البولية ثم إغلاق الكيس ونقله مباشرة بعد عملية التبول إلى المختبر وبسرعة دون تأخير حتى لا يتم تكاثر البكتيريا في البول والذي قد تنتج عنه وإعطاء نتائج خاطئة في عملية الزراعة.

أما الخطوات اللاحقة لعملية الجمع فهي :

1- إرسال العينة إلى المختبر لتزرع مباشرة في مدة لا تزيد عن ساعتين مع بقاء العينة على درجة حرارة الغرفة 25مْ.

2- إذا تعذر زراعة العينة مباشرة توضع في الثلاجة على درجة حرارة 2-5 مْ لمدة لا تزيد عن 24 ساعة ويفضل نقل عينة البول في صندوق مبرد Cooling box إلى مختبر آخر عند الحاجة.

3- ويمكن حفظ البول بإضافة وسط Becton-Dickinson كوسط حافظ لعينة البول مع بقاء العينة بدرجة حرارة الغرفة إذ أن هذه المادة تحافظ على البكتيريا الموجودة في البول لمدة 24 ساعة كذلك يمكن إضافة طبقة من مادة التولوين Toluene على سطح العينة وذلك كإجراء وقائي وحافظ للعينة إذ تمنع هذه الطبقة من ملامسة الهواء لعينة البول وبالتالي منع التلوث الخارجي للعينة بحيث تستخدم هذه الطريقة لحفظ العينة لفترة زمنية قصيرة .

المراحل المتبعة في فحص البول جرثوميا:

الفحص الروتيني للبول والذي يتضمن :.

أ-الفحص الظاهري Macroscopic examination :

ويتم بملاحظة اللون و العكورة ويستخدم حالياً شريط خاص يمكن من خلاله الاستدلال على وجود كريات الدم البيضاء و الحمراء والنترات Nitrite وغيرها.

ب-الفحص المجهري Microscopic examination :

يتم اخذ جزء من العينة (8-10) مل في ظروف معقمة ثم عمل طرد مركزي لهذا الجزء ودراسة الراسب تحت المجهر لملاحظة وجود كريات الدم البيضاء و الحمراء و الاسطوانات casts والبلورات crystals والبكتيريا وغيرها إذ يترافق التهاب المسالك البولية عادة بوجود عدد كبير من كريات الدم البيضاء القيحية Pus cells و البكتيريا مع العينة.

ويستخدم الفحص الروتيني للبول قبل عملية الزراعة من اجل :

1- التأكد من وجود دلائل الالتهاب .

2 -التأكد من خلو البول من الطفيليات مثل التريكومونس Trichomonas أو الفطريات Fungi التي تعتبر أيضا من مسببات التهاب المسالك البولية.

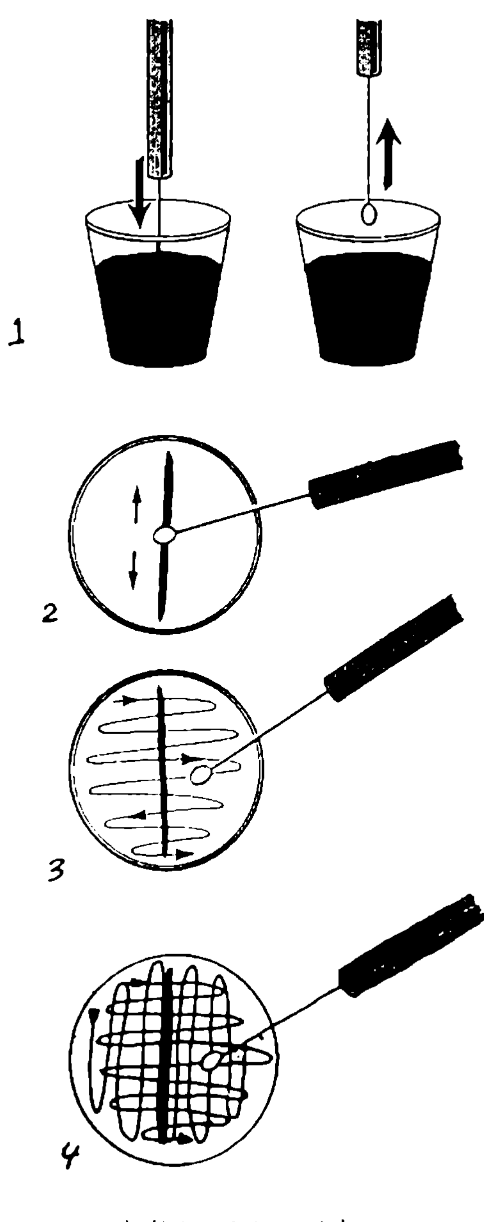
2- زراعة البول Urine-Culture :

كما أسلفنا تستخدم عملية الزراعة لتحديد النوع البكتيري المسبب للالتهاب يفضل قبل عملية الزراعة الأخذ بما يلي :-

1- أعداد الأوساط اللازمة والمناسبة للبكتريا المتوقع وجودها في العينة .

2- توفير جو معقم للقيام بعملية الزراعة .

3- يجب عدم زراعة البول في جو لا هوائي anaerobic وذلك لوجود الساكن الطبيعي اللاهوائي anaerobic Normal Flora في الاحليل والمناطق المحيطة به أما إذ كان المسبب المتوقع للالتهاب لا هوائياً فيفضل اخذ العينة عن طريق إدخال إبرة إلى المثانة وسحب البول منها مباشرة Needle Aspiration .



خطوات زراعة عينة البول

4- لا يفضل عمل طرد مركزي لعينة البول ومن ثم استخدام الراسب للزراعة وذلك لان عملية الطرد المركزي تؤدي إلى زيادة عدد الجراثيم في الملليتر الواحد من العينة كذلك قد تزيد أيضاً من عدد الجراثيم الملوثة غير المرضة القادمة من المحيط الخارجي في العينة .

ولقد أجمع العلماء على أن افضل طريقة لزراعة البول هي الطريقة الكمية Quantitative method وذلك من اجل الحصول على تعداد للبكتريا في الملليتر الواحد من العينة والذي يميز بما يسمى بوحدة تكوين المستعمرة CFU/ml وتستخدم هذه الطريقة للتميز بين تلوث العينة بالبكتيريا غير المرضة أو وجود الإصابة فعلاً . و تتم عملية الزراعة بأحد الطرق التالية :.

1- طريقة التخطيط المباشر Direct streak method.

(باستخدام الحلقة المعدنية القياسية Calibrated Loop).

وتستخدم هنا حلقة معدنية Loop ذات قطر معين تحمل كمية من العينة تعادل (1000:1) من العينة (0.001ml) حيث يحدد عدد الجراثيم من (1مل) من العينة بالقانون التالي:

عدد الجراثيم من المليمتر الواحد من العينة(CFU/ml) :

= حجم Loop(معامل التخفيف) X عدد المستعمرات النامية على الوسط

مثال:

عند زراعة عينة بول بواسطة حلقة معدنية Loopقياسية تم ظهور عشرة مستعمرات على الوسط الزراعي الصلب لذلك فان عدد الجراثيم في المليمتر الواحد من العينة (CFU/ml) هو= 1000 x10 = 10,000 CFU ml(10^4 CFU/ml)

ملاحظة : قد تستخدم حلقة قياسية Loop قادرة على حمل جزء واحد من عشرة أجزاء من العينة 0.01ml لذا يكون معامل التخفيف هنا هو 100 .

وتتم عملية الزراعة بهذه الطريقة بالخطوات التالية :.

1- خلط عينة البول بشكل جيد .

2- حرق الحلقة Loopجيداً باللهب ثم تركها حتى تبرد .

3- غمس الحلقة في عينة البول (اسفل سطح العينة مباشرة).

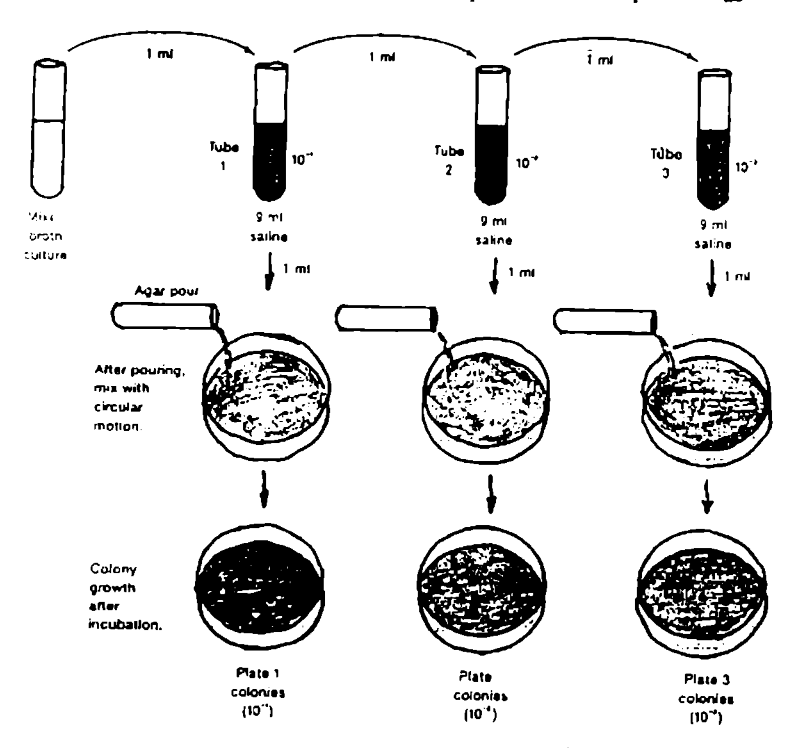
4- نقل الحلقة بما تحتويه من العينة إلى الطبق المخصص للزراعة وعمل التخطيط كما في الشكل التالي:

5- تكرر العملية على كل طبق زراعي كما سبق.

6- حضن الأطباق على درجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة في ظروف هوائية .

7- مراقبة النمو فأن لم يظهر النمو خلال 24 ساعة تترك الأطباق ليوم آخر (48 ساعة) في الحاضنة وعند بقاء الوضع كما هو علية في عدم ظهور النمو تسجل النتيجة كالتالي . No growth after 48 hours.

2- طريقة الصب Pour plate method.



خطوات زراعة عينة البول بطريقة الصب

لا تعطي هذه الطريقة نتيجة حقيقية لعدد البكتيريا في العينة وذلك بسبب حدوث تجمعات Clumps من المستعمرات والتي تبدو كمستعمرة واحدة عند العد إلا إنها تعتبر من أدق الطرق المتبعة لمعرفة عدد البكتيريا وتجري هذه الطريقة كالآتي:

أ - تحضير ثلاث تخفيفات للبول مع الماء المقطر والمعقم في أنبوب محكم الإغلاق كالآتي:

10:1 = 1مل بول + 9مل ماء

100:1 = 1مل من التخفيف السابق (10:1) + 9 مل ماء

1000:1 = 1مل من التخفيف السابق (100:1) + 9مل ماء

ب: ينقل 1مل من كل تخفيف إلى طبق زراعي (يحتوي على 15-20 مل من Nutrient agar مذاب ومبرد درجة حرارته 50مْ) ثم يخلط ويترك ليجمد على درجة حرارة الغرفة .

ج-تحضن الأطباق الثلاثة في الحاضنة على درجة حرارة 35 مْ لمدة 24 ساعة .

د- تقرأ النتائج بعد 24 ساعة من الحضانة وتعد المستعمرات في كل طبق ويضرب العدد في معامل التخفيف لكل طبق .

مثلاً : إذا كان عدد المستعمرات في الطبق الأول 200 مستعمرة فيكون عدد البكتيريا في 1مل من العينة هو 200 x10 =2000 بكتيريا لكل مل من العينة .

الأوساط الزراعية Culture media .

تزرع عينة البول غالباً على نوعين من الأوساط الزراعية :.

أ - الأول وسط الدم Blood agar وهو وسط غني وملائم لنمو معظم أنواع البكتيريا الموجبة و السالبة لصبغة غرام.

ب- أما النوع الثاني فهي أوساط اختيارية مفرقة مثلEMBو MacConkey agar إذ أنها أوساط ملائمة لنمو البكتيريا السالبة لصبغة غرام فقط وتعطى دلالة لونية على البكتيريا القادرة على تخمير اللاكتوز .

كذلك يمكن استخدام أوساط أخرى خاصة بأنواع معينة من البكتيريا مثلاً عند الشك بوجود بكتيريا M.tuberculosis يجرى للعينة طرد مركزي ويأخذ جزء من الراسب ويصبغ بصبغة Ziehl Neelsen stain ثم يحقن الجزء الآخر في وسط L.J.media وقد تستخدم أوساط أخرى خاصة بالفطريات مثلاً وسط SDA.

ويستخدم أيضا الوسط السائل Thyoglucollate broth كوسط غذائي في حال كون عدد الجراثيم قليلاً في عينة البول أو في حالة الشك بوجود جراثيم لا هوائية ،ونادراً ما تستخدم أوساط أخرى خاصة بالفيروسات وغيرها من الكائنات الدقيقة الأخرى التي يتم تشخيص الإصابة بها بطرق أخرى غير الزراعة مثل الطرق المصلية Serology .

تقييم نتائج الزراعة وتشخيص المسبب :.

يتم تقييم نتائج زراعة عينة البول من خلال مجموعة من الخطوات مجتمعة مع بعضها البعض وتتلخص بما يلي:.

أولا: تحديد نوع الكائن الموجود في العينة Type of organism .

يتم تحديد الكائن المسبب للالتهاب بعد عملية الزراعة من خلال خطوات متسلسلة ودقيقة يتبعها التعرف إلى نوع الكائن الدقيق المسبب للالتهاب والتمييز بين كون هذا الكائن الناتج من عملية الزراعة مرضياً أو كونه ساكناً طبيعياً وملوثاً للعينة ويتم ذلك من خلال ثلاث خطوات عامة كما يلي:

1- دراسة صفات المستعمرات النامية في الأطباق كتحديد لون وشكل المستعمرة.
2- عمل صبغة غرام Gram stain للتعرف إلى شكل وترتيب البكتيريا وتفاعلها مع الصبغة.
3- إجراء الفحوصات البيوكيميائية Biochemical test للوصول إلى تحديد نوع الكائن الدقيق المسبب للالتهاب نهائياً.

ويتم تشخيص الكائنات الدقيقة المسببة لالتهابات المسالك البولية UTI والأكثر شيوعاً كما يلي :.

1- ظهور نمو على وسط Blood agar وعدم ظهور النمو على MacC أو EMB.

يعني ذلك إن البكتيريا النامية هي موجبة لصبغة غرام (G +ve) إذ يتم إجـراء صبغة غرام Gram stain على النمو للتأكد من ذلك ولمعرفة شكل البكتيريا هـل هـي عصوية Bacilli أم كروية Cocci كذلك يمكن التعرف علي ترتيب البكتيريـا بواسـطة الصبغة فظهور الترتيب العنقودي دلالة علـى بكتيريـا Staphylococcus أمـا بكتيريـا Streptococcus فتكون مرتبة بشكل سلسلة (سبحية) .

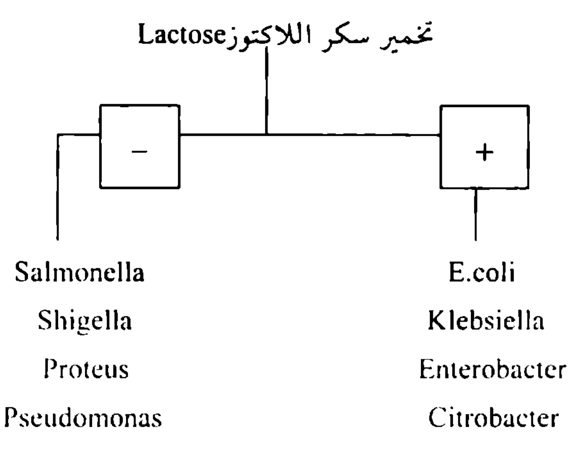
ويتم التفريق بـين بكتيريـا Staph و Strept بواسـطة فحـص Catalase وبواسطة شكل المستعمرات ولونها وتحليلها للدم كما في الجدول اللاحق.

وجه المقارنة	Staphylococcus	Streptococcus
النمو على وسط Blood agar	+	+
النمـو علـى وسـط EMB و MacC.	-	-
فحص Catalase	+	-
حجم المستعمرات على الأوساط بعد مرور 24 ساعة في الحاضنة.	3-5mm	1-2mm
شكل البكتيريا .	كروية على شكل عناقيد Cluster	كروية تنتظم على شكل سلاسل
تفاعلها مع صبغة غرام.	موجبة	موجبة
تحليلها للدم .	غير محللة للدم ما عدا S.aureus	معظمها محللة للدم
شكل المستعمرات.	مرتفعة من الوسط على شكل القبة	قرصية الشكل
لون المستعمرات.	ابيض إلى اصفر ذهبي	ابيض حليبي

2- أما ظهور النمو على كلا الطبقين Blood agar و.MacC أو EMB.

فهذا يدل على إن البكتيريا النامية على الوسط هي سالبة لصبغة غرام - G) ve) لذا يتم إجراء صبغة غرام لتحديد هل البكتيريا عصوية أم كروية وفي الغالب تكون البكتيريا العصوية السالبة لصبغة غرام هي اكثر المسببات لالتهابات المسالك البولية .

ويتم أيضا معرفة هل البكتيريا مخمرة أم غير مخمرة لسكر اللاكتوز مباشرة من خلال النمو على MacConkey agar فظهور اللون الوردي Pink colour دلالة على تخمير سكر اللاكتوز.



Salmonella	E.coli
Shigella	Klebsiella
Proteus	Enterobacter
Pseudomonas	Citrobacter

* ويمكن تميز E.coli عن Enterobacter على وسط EMB بظهور اللون الأخضر اللامع Metallic sheen الخاص ببكتيريا E.coli.

* أما بكتيريا Proteus فتتميز بنموها المنتشر spreading growth (Swarming) على أي نوع من الأوساط السابقة .

* ويتم تمييز بكتيريا Klebsiella بسهولة من خلال تكوينها لمستعمرات مخاطية على نوعي الأوساط السابقة.

3- أما الفطريات وخاصة فطر Candida تظهر مستعمراتها على Blood agar أو MacConkey مشابهة لمستعمرات بكتيريا .Staph ويمكن تمييز مستعمرات Candida عن مستعمرات البكتيريا من خلال الصبغ بصبغة غرام أو عمل

فحصي catalase و Coagulase إذ أن الفطريات لا تأخذ الصبغة دائماً وتعطي نتيجة سلبية للفحصين السابقين . ويفضل عمل تحضير رطب Wet mount من العينة مباشرة أو المستعمرات لتشخيص الفطريات التي تكون علي شكل خلايا بيضوية متبرعمة اكبر حجماً من البكتيريا .

ثانيا :- تحديد عدد الجراثيم في (1 مل من العينة) :

إن عدد المستعمرات الناتجة ذات دلالة مرتبطة في نوع الكائن النامي في الطبق إذ إن زيادتها يؤكد وجود التهاب ويتم تحديد عدد الأحياء الدقيقة كما ذكرنا سابقا بوحدة تكوين المستعمرة Colony forming unite(CFU) والتي تعرف على أنها عدد الأحياء الدقيقة الموجود أصلا في 1مل من العينة الأصلية والتي تعطي مستعمرات فيما بعد على الأوساط الزراعية ويتم معرفة عدد الأحياء الدقيقة في 1مل من العينة من خلال معرفة عدد المستعمرات النامية و ضربه في مقلوب التخفيف كما أسلفنا .

وقد أظهرت الدراسات ارتباط عدد الأحياء الدقيقة في العينة بوجود الالتهاب من خلال ما يلي (وهذا خاص بعينة البول الوسطية وباستخدام حلقة معدنية Loop قطرها 0.001 ml) .

1- اقل من ($<10^3$ CFU/ml) تسجل النتيجة No growth .

2- وجود مستعمرات لنوع واحد من البكتيريا :.

3- اقل من ($< 10^4$ CFU/ml) احتمل تلوث العينة أو وجود الالتهاب ويحدد ذلك بوجود الأعراض .

* ما بين 10^4- 10^5 CFU /ml احتمال وجود الالتهاب لذلك يتم إجراء التشخيص أو فحص الحساسية للمضادات الحيوية على النمو .

* 10^5 CFU/ ml أو اكثر تأكيداً لوجود الالتهاب .

* ظهور S.aureus بأي عدد ذو دلالة مرضية .

* ظهور مستعمرات Yeast تسجل كنتيجة ذات دلالة مرضية .

ومن الجدير بالذكر انه في العديد من حالات التهاب المسالك البولية ونتيجة لعوامل متعددة يكون عدد المستعمرات النامية اقل من 10^3 CFU/ ml حيث تسجل النتيجة وتشخص ويجرى لها فحص الحساسية ويترك للطبيب الأمر اعتماداً على الأعراض ووجود كريات الدم البيضاء Pus cells في العينة .

3- ظهور نمو لنوعين من البكتيريا في الوسط:

وهذا يتطلب إعادة الزراعة مرة أخرى واخذ البول من المريض في ثلاثة أوعية الوعاء الأول والثاني يحتوي على البول الموجود في الاحليل أما الوعاء الثالث فيحتوى على البول الموجود في المثانة ويتم زراعة عينه من كل وعاء على وسط زراعي منفصل حيث تستخدم هذه الطريقة لتميز حالة تلوث العينة بالبكتيريا الطبيعية الموجودة في الاحليل عن حالة الالتهاب أما إذا أعيدت الزراعة وظهر نفس النوعين فيتم إتباع ما يلي :.

* في حال نمو كلا النوعين بأعداد تزيد عن 10^5 CFU/ ml يتم تشخيص النوعين وإجراء فحص الحساسية لكل نوع وحده.

* في حال ظهور نوع بأعداد تزيد عن 10^4 CFU/ml والنوع الآخر بأعداد اقل من 10^4 CFU/ml فيكون النوع الأكثر في العادة هو المسبب للالتهاب فيشخص ويجرى له فحص الحساسية للمضادات الحيوية ويتم تسجيل النوع الثاني بدون إجراء فحص الحساسية له.

* أما في حالة ظهور النوعين بأعداد اقل من 10^4 CFU/ ml فيكون الاحتمال الأكبر إن وجودهما هو تلوث للعينة . ولكن يتم ذكر ذلك بتقرير المختبر .

4- ظهور ثلاثة أنواع أو اكثر من البكتيريا Mix growth :

أ- إذا كانت الأعداد متساوية بدون وجود نوع يزيد بعدد المستعمرات عن الأنواع الأخرى فيعتبر ذلك تلوثاً للعينة .

ب- عند ظهور نوع سائد ومميز بعدده عن الأنواع الأخرى يعامل النوع السائد كمسبب للالتهاب ويشخص ويجرى له فحص حساسية للمضادات الحيوية

ويتم ذكر الأنواع الأخرى فقط إذ إن وجودها في الغالب تلوث للعينة.

وهناك طرق أخرى تساعد في التشخيص و الاستدلال على وجود الالتهاب وهي :

* إجراء صبغة غرام Gram stain للعينة مباشرة وتتم كما يلي :

- يتم اخذ قطرة من عينة البول مباشرة وبدون عملية الطرد المركزي .
- توضع القطرة على شريحة زجاجية دون أن يتم نشرها ثم تترك لتجف.
- يتم صبغ التحضير بصبغة غرام وفحصها تحت العدسة الزيتية .

النتائج :.

ظهور بكتيريا واحدة أو اكثر في حقل الجهر وتحت العدسة الزيتية دلالة على وجود البكتيريا في البول بعدد اكثر من 10^5 CFU/ ml كذلك ظهور كرية دم بيضاء واحدة متعددة الأنويه (PMN) أو اكثر في حقل الجهر وتحت العدسة الزيتية دلالة على وجود الالتهاب . مع العلم إن هذه الطريقة (الصبغة) غير دقيقة في تحديد العدد البكتيري الأقل من 10^5 CFU /ml .

شريط البول Dipstick :

يستخدم في المختبرات شريط (strip) يحتوى على عدة مربعات أهمها مربعان يدل أحدهما على وجود النترات Nitrite أما الثاني فيدل على وجود كريات الدم البيضاء المحببة Leukocytes .

إذ يدل مربع Nitrate على وجود بعض البكتيريا و القادرة على اختزال النترات Nitrate إلى Nitrite وهي مثل E.coli و Proteus و Pseudomonas أما المربع الثاني فهو يعطي دلالة على وجود كريات الدم البيضاء المحببة في البول إذ يكشف عن وجود أنزيم Leukocyte esterase الذي تنتجه كريات الدم البيضاءالمحببة .

التحليل الآلي لعينة البول Automated screening system :

في الوقت الحاضر ظهرت عدة طرق آلية لتحليل عينة البـول جرثومياً واهـم هذه التقنيات هي:.

1- تقنية Bac-T-screen :

تستخدم هذه التقنية للكشف عن وجود البكتيريا في البول إذ تسـتخدم هنـا ورقة ترشيح خاصة Filter paper معدة للقراءة في جهاز الطيف الضوئـي Spactro photometer حيـث تمـرر عينـة البـول خـلال ورقـة الترشـيح تحـت ضغـط سـلبي (Suction) فتلتصق الجزيئات الموجودة في العينة على الورقة ثم تمـرر صبغـة خاصـة عبر الورقة نفسها فيتم تلويـن الجزيئـات الملتصقـة بـها ثـم تقـرا الورقـة في جـهاز الطيف الضوئي وتقارن مع ورقة أخرى معياريه Standard .

ويمكن إن يلاحظ تغير اللون بالعين المجردة حيث تتم هذه العملية في وقت لا يتجاوز الدقيقتين وإذا لم يتغير لون الورقة تكون النتيجة سلبية ويتوقف العمل عند هذه المرحلـة أمـا إذا تغـير لـون الورقـة فيتـم زراعـة العينـة علـى أوسـاط زراعيـة لتشخيص المسبب.

2- تقنية Automicrobic system :

وهي طريقة آلية أخرى لتحديد مسبب التهاب المسالك البولية وتعتمـد هـذه الطريقة على قياس النمو البكتيري بجهاز الطيف الضوئي حيث يتم إدخال جزء من العينة في أوعية خاصة بهذه التقنية ، تحتوي على مواد غذائية خاصة بنمـو البكتيريـا المسببة لالتهابات المسـالك البولية فقط ثـم يتـم حضانـة هـذه الأوعيـة وبعـد 6-8 ساعات يبدأ الكائن الدقيق بالنمو و التكاثر إن وجد ويتم تحديـد ذلـك مـن خـلال تزايد العكورة turbidity بواسـطة جـهاز الطيـف الضوئـي الخـاص بـهذه التقنيـة ويكون هذا الجهاز معداً آليا للتعرف على البكتيريا وقراءة العدد إذ إن الجهاز مبرمج لإعطاء نتيجة سـلبية Negative urine culture في حـال ظـهور عـدد قليـل مـن المستعمرات البكتيرية .

التهاب البروستات Prostatitis :

توجد غدة البروستات في الذكور وهي تطرح إفرازاتها في مجرى البول وقد تتعرض هذه الغدة للالتهاب بعدد من الأحياء الدقيقة وتستخدم عينة البول في بعض الحالات لتشخيص التهاب البروستات وقد تعطى زراعة البول نتيجة خاطئة في حل وجود التهاب بروستات غير مشخص ويترك تحديد ذلك للطبيب المشرف.

الأحياء الدقيقة المسببة لالتهاب البروستات :.

1- الالتهاب البكتيري :

أ-المسببات الأكثر شيوعاً Pseudomonas و Klebsiella و E.coli .

ب-المسببات الأقل شيوعاً Staph.epidermidis وStrep.faecalis .

2- الالتهاب البكتيري الذي يعطى نتيجة زراعة سلبية No growth وينتج من Mycoplasma و Chlamydzia و البكتيريا اللاهوائية .

3- الالتهاب غير البكتيري وقد ينتج من :.

أ-الطفيليات مثل T.vaginalis .

ب-الفطريات مثل C. albicans.

التشخيص :

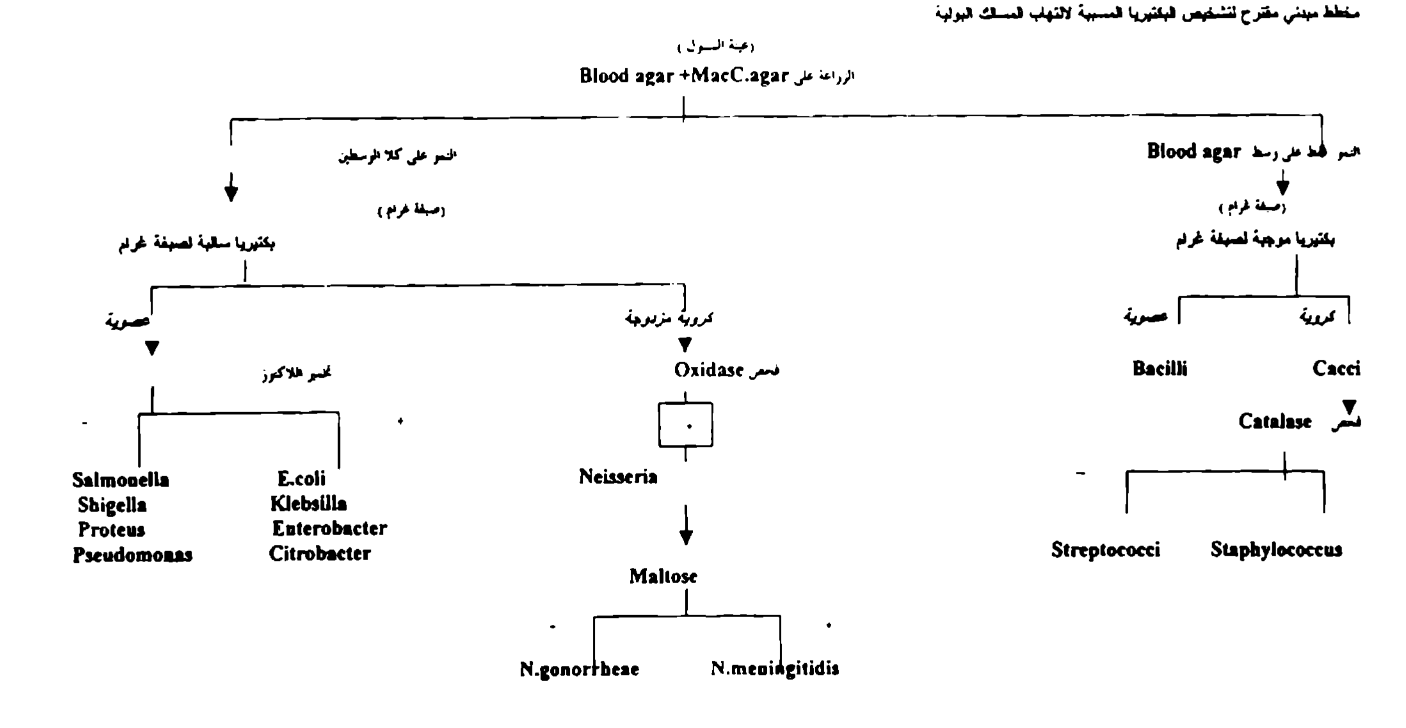
يعتبر البول والحيوانات المنوية و الإفرازات الناتجة من تدليك البروستات هي العينات المستخدمة في تشخيص التهاب البروستات إذ يتم زراعة العينة ومعاملتها بشكل مشابه لمعاملة عينة البول .

ملاحظة :

انه لمن الضروري بعد عملية الزراعة و تشخيص البكتيريا المسببة للالتهابات إجراء فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية (susceptibility) إذ يتم إجراء هذا الفحص لأي نوع بكتيري ينمو بعد زراعة أية عينة مرضية من اجل اختيار أنسب مضاد حيوي للنوع البكتيري النامي في الوسط الزراعي وتزويد الطبيب بنتيجة هذا الفحص مع نتيجة الزراعة .

كيفية إجراء فحص الحساسية و العوامل المؤثرة فيه انظر الملاحق .

مخطط مبدئي مقترح لتشخيص البكتيريا المسببة لالتهاب المسالك البولية



الباب الثاني

(التهابات الأمعاء Gastroenteritis)

عينة البراز (Stool specimne)

مقدمة :

تتألف القناة الهضمية في الإنسان Gastro Intestinal tract من عدة أعضاء متحدة فيما بينهما على شكل قناة مفتوحة الطرفين حيث تتركز فيها عمليات هضم وامتصاص المواد الغذائية ليأخذ الجسم الجزء اللازم له ويطرح ما تبقى من هذه المواد إلى الخارج على شكل براز (Feces , Stool) .

وتكون القناة الهضمية عند المواليد الجدد معقمة Steril إذ تبدأ الجراثيم بالدخول إليها مع الطعام والشراب لتكون مجتمعاً جرثومياً يتعايش مع الإنسان كساكن طبيعي Normal Flora وتزداد كثافة وعدد الأحياء الدقيقة الموجودة في الأمعاء كلما اتجهنا إلى الأسفل فمثلا تحتوي المعدة Stomach على حوالي 10^3 _10^5 كائن حي دقيق لكل غرام من محتوياتها مع أن حامضيتها العالية الناتجة من إفراز HCL ووجود هرمون البيبسين تؤدي إلى قتل العديد من الجراثيم ومنع دخولها إلى الأمعاء ومع ذلك فإن زيادة الساكن الطبيعي في المعدة لأي سبب قد يؤدي إلى حدوث تقرحات التهابات فيها .

وقد تستطيع بعض الجراثيم الضارة مقاومة حامضية المعدة والعبور إلى الأمعاء مثل بكتريا السل T .B وبكتريا H. pylori أو نتيجة لتكوينها للأبواغ Spores مثل بكتيريا C difficile،

أما في الأمعاء الدقيقة فيساعد الوسط القاعدي على تكاثر و زيادة الساكن الطبيعي فيها والذي يتراوح ما بين 10^6 _10^3 لكل غرام من المحتويات إلا أن سرعة مرور الطعام الناتجة من الحركة الدودية للأمعاء تؤدي إلى بقاء العدد قليلا مقارنة مع

العدد الموجود في نهاية الأمعاء إذ يحتوي كل غرام واحد من مكونات القولون والمستقيم على 10^{11}-10^{8} كائن حي دقيق والتي تكون حوالي 10-30% من كتلة البراز وذلك يعود إلى بقاء الفضلات في المستقيم والقولون لفترات زمنية طويلة نسبياً.

وتكون نسبة البكتيريا اللاهوائية حوالي 96-99% من مجمل الساكن الطبيعي للأمعاء بينما تشكل البكتيريا الهوائية الاختيارية حوالي 1-4% من مجمل الساكن الطبيعي في قولون الأشخاص البالغين ويلعب الساكن الطبيعي في أمعاء الإنسان دوراً مهماً في :.

1- المساعدة في تحطيم بعض المواد الغذائية التي يعجز الجسم عن تحطيمها مثل السليلوز للاستفادة منها .

2- المساعدة في إنتاج مواد مفيدة للجسم مثل Vit.K .

3- امتصاص بعض المواد الضارة بالجسم وتحويل بعض المواد مثل الصفراء Bile إلى مواد غير ضارة للجسم.

4- حماية الجسم من زيادة أعداد البكتيريا المرضية الداخلة إلى الأمعاء وبالتالي وقاية الجسم من الإصابة إذ أن انخفاض الساكن الطبيعي في الأمعاء لأي سبب مثل تعاطي كميات كبيرة من المضادات الحيوية يؤدي إلى خفض مقاومة الأمعاء للإصابة وحدوث الإسهالات والتهاب الأمعاء المرتبطة بالمضادات الحيوية Antibiotic-associated colitis أو ما يسمى بالتهاب القولون ذي الغشاء الكاذب Pseudo membranous colitis و الناتج من سموم البكتيريا الموجودة بالأمعاء بأعداد قليلة حيث يؤدي تناول كمية عالية من المضادات الحيوية كما أسلفنا إلى خلل في نسبها وزيادة كمية سموم هذه الأنواع التي تؤثر على الأمعاء.

التهابات القناة الهضمية Gastroenteritis :

تحدث التهابات القناة الهضمية نتيجة للإصابة بعدة أنواع من المسببات مثل البكتيريا والفيروسات ويعتبر ألم البطن والغثيان والتقيؤ و الإسهال والحمى أحيانا

جمع ونقل عينة البراز من اجل الزراعة Stool Collection and Transport :

من اجل جمع عينة براز سليمة ومفيدة في عملية تشخيص مسببات التـهابات القناة الهضمية يجب اتباع التعليمات التالية :.

1- يجب جمع عينة البراز في أوعية نظيفة ومعقمة ويفضل إن تكون بلاستيكية ويتم إغلاقها مباشرة بعد وضع العينة فيها.

2- يفضل جمع 2-3 عينات بأوقات مختلفـة وذلـك لزيـادة احتماليـة عـزل الكـائن المسبب للالتهاب .

3- يجب إن لا يقل حجم عينة البراز عن 2غم كعينة كافية للزراعة .

4- يجب زراعة العينة في وقت لا يتجاوز الساعتين من إعطائـها مـن قبـل المريـض وإذا أخذت العينة خارج المختبر يجب إيصالها إليه بأسرع وقت ممكن .

5- إذا تعذر زراعة العينة بسرعة يجب إن توضع في عبوة مع وسط نقلTransport media مثل وسط Cary-Blair أو أوساط Stuart ، ويستخدم مـاء الببتـون القاعدي AlkalinePeptonewater كوسط حفظ ونقل مناسب لنقـل العينـات المشـكوك باحتوائـها علـى جرثومـة الكولـيرا Vibrio SPP و لا يفضـل استخدام glycerol كمادة حافظة وذلك لسميتها لبكتريا Campylobacter كما يمكن وضع العينة في الثلاجة علـى درجـة حـرارة 2-8 مْ لفـترة لا تتجـاوز 24 ساعة .

المراحل المتبعة في فحص عينة البراز :.

1- الفحص الظاهري Macroscopic Examination :

و يتم هنا ملاحظة قوام ولون العينة وملاحظة وجود المخاط أو الدم أو أطوار الديدان وغيرها مما يلاحظ بالعين المجردة .

2-الفحص المجهري Microscopic Examination :

ويتم من خلال الفحص المجهري للتحضير الرطب تحديد مسبب الالتهاب إذا كان من :.

أ- الفطريات مثل Candida Spp

ب- الطفيليات وأطوارها مثل الاميبا والديدان وغيرها .

وظهور احد هذه الكائنات قد يكفي لتشخيص التهاب القناة المضمية ويستخدم المجهر لملاحظة وجود كريات الدم البيضاء و الحمراء في العينة ايضاً كدلائل على الالتهاب .

3-زراعة عينة البراز وعزل مسبب الالتهاب :

Cultures of stool and Isoloation of pathogenic agents :

كما اسلفنا فإن عينة البراز تحتوي على عدد كبير ومتنوع من البكتيريا مما يزيد من صعوبة عزل البكتيريا المسببة للالتهاب .ومن اجل تسهيل هذه العملية يجب اتباع ما يلي:.

1- عدم زراعة عينة البراز في ظروف لا هوائية وذلك لمنع نمو معظم أنواع الساكن الطبيعي البكتيري الموجود في العينة مع أن معظم مسببات التهابات الأمعاء هي بكتيريا هوائية اختيارية .

2- استخدام عدد من الاوساط الاختيارية و المفرقة Selective and differential media من اجل تثبيط نمو الساكن الطبيعي وتنمية البكتيريا المسببة للالتهاب فقط بحيث يجب أن تكون الاوساط المستخدمة تغطي الانواع البكتيرية الشائعة و المسببة للالتهابات المعوية وهي Campylobacter و vibrio و yersinia و Shigella و salmonella.

ملاحظة :- لا تعتبر تقنية صبغة غرامGram stain من الفحوصات الروتينية لعينة البراز بسبب احتواء العينة على عدد كبير ومتنوع من البكتيريا ولكنها يمكن إن تعطي الطبيب معلومات حول كون المرض ناتج من دخول البكتريا للخلايا Invasive Bacteria أو افرازها للسموم toxigenic Bacteria .

عزل بكتيريا السالمونيلا و الشيغلا Isolation of Salmonella and Shigella

تظهر بكتيريا Shigella و Salmonella في البراز خلال الطور الحاد من

الإصابة أي خلال الثلاثة ايام الاولى من الإسهال باعداد كبيرة لذلك يفضل اخذ جزء من البراز يحتوى على الدم أو الخلايا الطلائية وحقنة في أوساط الزراعة الخاصة.

اما في حالات صعوبة اعطاء عينة البراز (التعني الحاد Chronic dysentry) تأخذ العينة بوسطة التنظير Proctoscopic أو يمكن اخذ مسحة من المستقيم Rectal swab وزراعتها على أوساط مفرقة واختيارية .

ويتم عزل بكتيريا salmonella و shigella على عدة أوساط هي:.

1-أوساط مفرقة قليلة الإختيارية Differential mildly selection media

ويستخدم هنا في العادة وسط MacConkey agar أو EMB حيث يعتبر هذان الوسطان من الاوساط المفرقة التي تميز بين البكتيريا المخمرة للاكتوز والتي تظهر مستعمراتها باللون الوردي وبين غير المخمرة للاكتوز والتي تكون مستعمراتها شفافة غير ملونة وبما أن Salmonella وShigella غير مخمرة للاكتوز تكون مستعمراتها شفافة اما كون هذه المستعمرات اختيارية فلأنها تعمل على تثبيط معظم أنواع البكتيريا الموجبة لصبغة غرام وتنمي البكتيريا السالبة لصبغة غرام .

2- أوساط مفرقة متوسطة الاختيارية :

Differentially moderately selective media :

وتعتبر الاوساط التالية أهم ثلاثة أوساط تابعة لهذا النوع ويوصى باستخدامها وذلك لقدرتها على تثبيط نمو الساكن الطبيعي في الأمعاء وتنمية Shigella و Salmonella فقط.

أ- وسط Hektoen-Enteric agar :

ويتعبر هذا الوسط اختيارياً بسبب احتوائه على تركيز عالٍ من املاح الصفراء Bile saltes اما كونه وسطاً مفرقاً بسبب احتوائه على الكربوهيدرات إذ يفرق بين البكتيريا القادرة على تخمير الكربوهيدرات وانتاج غاز H_2S عن غير القادرة على ذلك .

ويكون لون الوسط الطبيعي اخضر وظهور مستعمرات صفراء دليل على تخمير الكربوهيدرات لذلك تظهر مستعمرات Salmonella و Shigella شفافة لعدم قدرتها على تخمير الكربوهيدرات الموجودة في الوسط .بينما ظهور نقطة سوداء في منتصف المستعمرة دليل على إنتاج غازH_2S وترسبه باللون الاسود على المستعمرة وهذا من خصائص بكتيريا Salmonella.

وقد تعطي بعض أنواع البكتيريا مثلProteus وProvidencia وMorganella نفس التفاعلات السابقة مع الوسط .

ب- وسط Xylose-Lysine-Deoxy cholate (XLD) :

وهو وسط ذو لون احمر عند تحضيره ولكن يتحول إلى اللون الاصفر في حالة نمو بكتيريا مخمرة للكربوهيدرات علية وهو مشابه للوسط السابق في كافة نتائجه وتداخلاته مع الانواع البكتيرية الاخرى ويعتبر افضل وسط لعزل بكتيريا Shigella.

ج- وسط Salmonella – Shigella agar (S-S agar) :

وهو وسط ذو لون قشي فاتح Light straw color وتعطي البكتريا المخمرة للكربوهيدرات علية نمواً ذا لون احمر وهو مشابه للسابقة في كافة نتائجة وتداخلاته مع الأنواع البكتيرية الأخرى .

ويستخدم وسط Desoxycholate citrate agar كوسط مفرق متوسط الاختيارية ايضاً لعزل Shigella and Salmonella.

3- أوساط مفرقة عالية الاختيارية Highly selective media .

مثل وسط Bismuth sulfite agar وهو وسط خاص بتنمية بكتيريا Salmonella فقط بسبب احتوائه على تركيز عالي من الصبغةbrilliant green وأملاح Bismuth و يكون لونه عند التحضير رمادياً لامعاً حيث تظهر مستعمرات بكتيريا Salmonella typhi سوداء اللون محاطة بمنطقة خضراء لماعة metallic sheen بينما الانواع الاخرى من هذه البكتيريا فتظهر اما شفافة أو خضراء أو سوداء .

4-أوساط اختيارية غنية Selective enrichment media .

وهي أوساط سائلة تستخدم للقضاء على كافة أنواع البكتيريا الموجودة في عينة البراز ماعدا بكتيريا Salmonella و Shigella بحيث يتم تنشيط نمو هذين النوعين من خلال المواد الغذائية الموجودة في الوسط إذ يتم حقن جزء من عينة البراز في الوسط السائل ويحضن الوسط لمدة 8-18 ساعة ثم يتم عمل زراعة اخرى Sub culture على أوساط مفرقة للتمييز بين Salmonella and Shigella في حال وجود احدهما . ومن امثلة هذا النوع من الاوساط وسط Selenite broth ووسط Tetrathionate Broth و وسط GN Broth .

خطوات الزراعة Procedures for Culturing stool :

ومن اجل عملية عزل دقيقة لبكتيريا Salmonella و Shigella من البراز يفضل اتباع ما يلي:.

1- اخذ كمية من البراز بواسطة ماسحة قطنية Cotton swab.

2- زراعة العينة بواسطة التخطيط بالماسحة القطنية وبقوة على وسطين أو اكثر من الأوساط التالية .ويفضل إن يكون احداهما عالي الأختيارية highly selective والآخر متوسط الأختيارية moderately selective مثل الأوساط التالية :.

- S-S agar
- Hekton enteric aga
- Brilliant green agar
- XLD agar
- Desoxy cholate cirate agar

ويفضل اجراء تخطيط بواسطة الحلقة المعدنية Loop بعد اجراء الزراعة بواسطة الماسحة Swab من اجل الحصول على مستعمرات منفصلة ويمكن وضع جزء من عينة البراز في وسط اختياري غني سائل Selective enrichment media

وبعد فترة من الحضانة يتم اجراء التخطيط Streaking على احد الاوساط السابقة بواسطة الحلقة المعدنية Loop مباشرة .

3- في نفس الوقت يتم نشر جزء من العينة كما في الخطوة السابقة على أوساط مفرقة مثل MacConkey agar and EMB .

4- يفضل استخدام وسط Bismuth sulfite agar لتشخيص الإصابة ببكتيريا التفوئيد وذلك ينشر كمية كبيرة من العينة على سطح الوسط .

5- ويفضل حقن جزء من العينة في وسط اختياري غني Selective enrichment media مثل وسطي Selenite or GN broth ثم يحضن الوسط لمدة 24 ساعة وبعد ذلك يتم نقل جزء من العينة بواسطة الحلقة المعدنية Loop (وبواقع 2-3 مرات) ثم تزرع على وسطين أو اكثر من التالية MacConkey , XLD ,EMB .

6- يتم حضن الأوساط المزروعة على درجة 35 مْ لمدة 18-24 ساعة وفى حالة عدم وجود النمو تستمر الحضانة لمدة 24 ساعة اخرى (48 ساعة حضانة) بينما يحتاج وسط Bismuth sulfite agar لفترة زمنية اطول من ذلك .

7- بعد فترة الحضانة تفحص الأطباق بدقة باستخدام اضاءة كافية لمشاهدة النمو.

النتائج: تظهر مستعمرات Salmonella and Shigella على معظم الاوساط السابقة شفافة وقد تاخذ اللون الاحمر على وسط XLD وتظهر مستعمرات S.typhi سوداء اللون على وسط Bismuth sulfate agar.

عزل بكتيريا Yersinia enterocolitica :

يستخدم وسط Cefsulodin-irgasan-Novobiocin (CIN) agar كوسط اختياري خاص لعزل بكتيريا Yersinia من البراز إذ يتكون هذا الوسط من مواد غذائية متعددة بالاضافة إلى المضادات الحيوية .

حيث يتم نشر العينة على سطح الوسط بواسطة التخطيط ثم يحضن الوسط لمدة 48 ساعة على درجة حرارة الغرفة .فتظهر مستعمرات Yersinia بعد

فترة الحضانة بلون زهري لامع bright pink حمراء المركز.

الا أن هذا الوسط يمكن إن يسمح بنمو بكتيريا Citrobacter and Aeromonas واللتين تشبهان Yersinia في ظروف النمو وللتمييز بينهما يتم عمل زراعة اخرى sub culture على وسط Blood agar ثم عمل الفحوصات البيوكميائية ، ويتم التفريق بين Yersinia و Aeromonas بواسطة فحص Oxidase إذ تكون الاولى سالبة و الثانية موجبة النتيجة لهذا الفحص .

ويمكن عزل Y.enterocolitica على وسطي Blood agar and MacConkey agar إذ تنمو على وسط B.A خلال 24 ساعة مكونة مستعمرات صغيرة وتكون سريعة النمو ومتحركة على درجة حرارة الغرفة وهي غير مخمرة للاكتوز سالبة لصبغة غرام ولفحص Oxidase وموجبة لفحص Urease بحيث يمكن تمييزها عن الانواع الاخرى التي قد تنمو معها على نفس الأوساط بواسطة الفحوصات المصلية و البيوكيميائية .

عزل بكتيريا Vibrio :

تنمو بكتيريا Vibrio والمسببة لمرض الكوليرا على عدة أوساط الا إن افضل وسط لعزلها و للتمييز بين انواعها هو وسط Thiosulfate citrate -bile salts sucrose agar (TCBS) الذي يعتبر وسطاً اختيارياً ومفرقاً خاصاً بتنمية بكتيريا Vibrio اذ تنمومستعمرات V.Cholera وتكون صفراء اللون على هذا الوسط بينما النوع V.Parahaemolyticus يعطي مستعمرات خضراء اللون على هذا الوسط.

عزل بكتيريا Campylobacter :

تسبب عدة أنواع من هذه البكتيريا التهابات الأمعاء لدى الإنسان ويتم عزلها من البراز بأستخدام أوساط اختيارية خاصة بهذه البكتيريا مثل وسط Campy-Blood agar و وسط Skirrows media حيث يتم نشر العينة على الوسط ثم حضن الوسط على درجة حرارة 42مْ لمدة 48 ساعة بوجود 10% CO2 .

ويعتبر الوسط الاول افضل وسط لعزل النوع C.Jejuni بينما الثاني فهو مفيد لعزل كافة أنواع هذه البكتيريا . إذ يمكن حضنه على درجة حرارة تتراوح بين 36-37 درجة مئوية .

عزل بكتيريا Helicobacter pylori :

تعتبر هذه البكتيريا من أهم مسببات قرحة المعدة والاثني عشرduodenal (Peptic) ulcer ويتم عزلها بأخذ عينة نسيجية من مكان التقرحGastric biopsy ثم اجراء احد الفحوصات التالية على العينة :.

1- عمل مسحة Smear من النسيج المأخوذ من مكان الالتهاب وصبغها بصبغة Giemsa لمشاهدة البكتيريا التي تكون منحنية الشكل curved أو لولبية الشكل spiral .

2- تتشابه هذه البكتيريا مع بكتيريا C. jejuni في الصفات العامة لذلك تزرع عينة النسيج على وسط Campy- Blood agar أو وسط Skirrows media مضاف إليها عدد من المضادات الحيوية مثل Trimethoprim و Vancomycin .

ويمكن زراعة العينة على وسط Chocolate agae أو أي وسط اختياري آخر يضاف لها بعض المضادات الحيوية مثل Amphotericin و Nalidixc acid و Vancomycin لقتل البكتيريا الملوثة للعينة .

ويتم حضن الوسط على درجة حرارة 37مْ لمدة 3-6 ايام بحيث تظهر مستعمرات لماعة بقطر يتراوح بين 1-2 ملم .

3- تنتج هذه البكتيريا انزيم اليوريز Urease بقوة لذلك يمكن وضع النسيج في وسط سائل Urease media يحتوي على اليوريا بحيث يؤدي إنتاج البكتيريا لانزيم Urease إلى تغير لون الوسط في خلال 15-30 دقيقة من اضافة العينة .

عزل بكتيريا E.coli :

توجد هذه البكتيريا في أمعاء الإنسان كساكن طبيعي إلا أن بعض انواعها المصلية Serotype تسبب الاسهالات لدى الاطفال حديثي الولادة بسبب افرازها

لنوع من السموم ويعتبر النوع المصليE.coli O157: H7 هو اكثر أنواع هذه البكتيريا المسببة للاسهالات شيوعاً.

إذ يتم اخذ عينة من البراز أو المسحات الشرجية وزراعتها على وسطBlood agar و أوساط اختيارية اخرى مثل MacConkey agar و EMB ثم تحضن الاطباق على درجة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وعند ظهور ثلاث مستعمرات أو اكثر لهذه البكتيريا يتم اخذ جزء من المستعمرة ثم معاملة هذا الجزء مع اجسام مضادة خاصة بكل نوع مصلي لوحده من

أنواع E.coli التي قد تسبب حالات الاسهالات على شريحة خاصة حيث تكون النتيجة الايجابية على شكل تخثر Agglutination.

ويمكن زراعة العينة على وسط Sorbitol MacConkey agar اذ أن95بالمائة من أنواع بكتيريا E.coliقادرة على تخمير هذا السكر بينما النوع المصلي O157:H7يعطي نتيجة سلبية لهذا الفحص (غير قادر إلى تخمير سكر Sorbitol)

عزل البكتريا المسببة للالتهابات المرتبطة بالمضادات الحيوية،

Isolation of antibiotic - associated colitis bacteria:

إن تناول كميات كبيرة من المضادات الحيوية كما ذكرنا سابقاً قد تؤدي إلى خلل في توازن الساكن الطبيعي داخل الأمعاء مما يؤدي إلى زيادة أنواع بكتيرية معينة على حساب أنواع اخرى بحيث يؤدي زيادة نوع معين إلى التهابات معوية مثل التهاب القولون ذي الغشاء الكاذب Pseudomembranous colitis مسبباً حمى واسهالاً وألماً في البطن واهم أنواع البكتيريا المسببة لذلك هي S.aureus وCl. difficile التي يتم عزلها بالطرق التالية :.

تزرع بكتيريا Cl.difficile على وسطCycloserine-Cefoxitin (CCFA) eggyolk agar ثم تحضن لمدة 24 ساعة لتظهر مستعمرات هذه البكتيريا صفراء لامعة دائرية ذات حواف غير منتظمة مسطحة ومنخفضة بقطر 4-8 ملم.

بينما تستخدم عدة أوساط لعزل بكتيريا S.aureus وكافة Coagulase Gram Positive Bacteria تحتوي بالاساس على تركيز عالي من Nacl وهي مثل

وسط110 Staph.medium و وسط Mannitol salt agar و وسط Polymyxin
Staph media.

عزل بكتيريا السل M . tuberculosis :

في بعض حالات السل الرئوخاصة عند الأطفال وكبار السن يصعب اخذ عينة من البلغم لذلك يحتاج الطبيب لعزل عصيات السل من البراز التي قد تكون وصلت إليه نتيجة لنزول البكتيريا من الرئة إلى الأمعاء إذ يتم زراعة العينة على وسط خاص هو Lowenstein-Jensen media و يعتبر عزل هذه البكتيريا من البراز أمراً غير روتيني يحتاج لطلب خاص من الطبيب المعالج .

عزل الفطريات Isolation of fungi :

توجد بعض الفطريات وخاصة فطر Candida albicans بشكل الخميرة Yeast cells في أمعاء الإنسان باعداد قليلة كساكن طبيعي إذ يتاثر عددها ويزداد بضعف مناعة الجسم وقد اشارت بعض المراجع إلى أن وجود خلايا الخميرة Yeast cells وخيوط الفطر Mycelium معاً في البراز ذو دلالة مرضية . بينما ظهور خلايا الخميرة Yeast cells وحدها وبكميات قليلة مظهر طبيعي ، ويتم تشخيص ذلك بعمل تحضير رطب لعينة البراز ومشاهدة الشريحة تحت المجهر .

ويتم عزل الفطريات بشكل عام بزراعة العينة على أوساط خاصة بالفطريات مثل وسط SDA ثم تحضن على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة ويظهر نمو Candida بشكل مستعمرات بيضاء حليبية مشابهة لمستعمرات البكتيريا Cream-colored colonies.

ملاحظات :

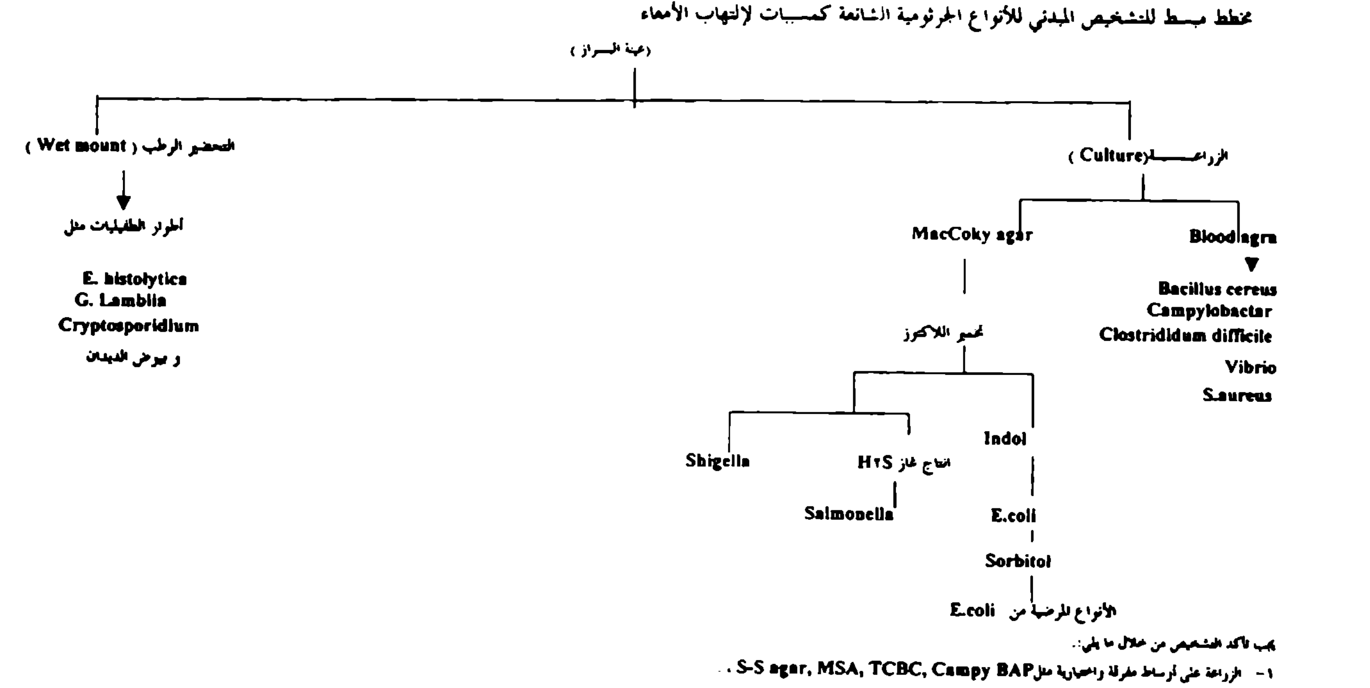
- إن ظهور 1-2 مستعمرة من الانواع البكتيرية المرضة في عينة البراز يعتبر وجوداً غير طبيعي لذلك يفضل في هذه الحالة اعادة الزراعة مرة اخرى .
- يتم اللجوء في بعض حالات التهابات الأمعاء وخاصة حالات التسمم الغذائي إلى البحث عن سموم البكتيريا في عينة البراز بدل عملية الزراعة بواسطة تقنيات خاصة بذلك .

يجب اجراء الفحوصات البيوكيميائية والزراعة على وسط TSI للمستعمرات النامية على الاوساط الزراعية للتاكد من التشخيص .

يتم اللجوء حالياً في تشخيص وجود بعض البكتيريا المسببة لالتهابات الأمعاء عن طريق الدم من خلال الفحوصات المصلية Serological test بالبحث عن الأنتجينات Antigenes أو الاجسام المضادة Antibodes التي كونها الجسم نتيجة الإصابة كما في حالة تشخيص بكتيريا Salmonella أو H. pylori .

يجب اجراء فحص التحسس للمضادات الحيوية لأي بكتيريا مرضية تنمو على الاوساط الزراعية وتزويد الطبيب المعالج بالتشخيص ونتيجة الفحص .

مخطط مبسط للتشخيص المبدئي للأنواع الجرثومية الشائعة كمسببات لإلتهاب الأمعاء



يجب تأكيد التشخيص من خلال ما يلي:-

١- الزراعة على أوساط مفرقة واختيارية مثل S-S agar, MSA, TCBC, Campy BAP .

٢- عملية الصبغ وخاصة صبغ الأنواع .

٣- الفحوصات المصلية والبيوكيميائية .

الباب الثالث

التهابات الجهاز التناسلي

Genital Tract infection

(مسحات الجهاز التناسلي G.T.swabs)

مقدمة :

يختلف الجهاز التناسلي في الذكر والأنثى عن بعضها البعض من الناحية التشريحية وخاصة في كون الفتحة التناسلية منفصلة عن الفتحة البولية في الأنثى ومشتركة في الذكر وهذا قد يؤدي في الذكر إلى تداخل التهاب الجهازين البولي و التناسلي معاً أما الأنثى فقد يكون التهاب أحدهما سببا في التهاب الآخر نتيجة لقرب الفتحتين من بعض .

وتكون التهابات الجهاز التناسلي في الإنسان نتيجة للعديد من المسببات البكتيرية و الفيروسية والفطرية التي قد تصل إلى أي جزء من أجزاء هذا الجهاز بحيث تبدأ الإصابة عند الفتحة التناسلية وتتجه راجعة إلى الخلف في حالة الالتهابات المزمنة لتصل باقي الأعضاء .

ويحتوي الجهاز التناسلي للذكر الطبيعي على حوالي10^3-10^2 كائن حي دقيق كساكن طبيعي في الاحليل Urethra بينما في الأنثى الطبيعية وبعد الولادة مباشرة يبدأ الساكن الطبيعي بأخذ مكانة في منطقة المهبل Vagina واسفل الرحم بحيث توجد أنواع متعددة من البكتيريا اللاهوائية Anerobic Bacteria وخاصةً بكتيريا Lactobeilli التي تعمل على تخمير الجلايكوجين glycogen الموجود في الرحم والمهبل بحيث ينتج في هذه العملية حامض اللاكتيك Lactic acid الذي يعمل على المحافظة على درجة PH حامضية في تلك المنطقة وهذا بدوره يعمل على حماية الأجزاء التي تليه من الجهاز التناسلي الأنثوي بحيث يقتل و يمنع دخول أنواع البكتيريا الممرضة إلى الداخل .

كذلك تفرز الطبقة المخاطية للرحم مواد مضادة للجراثيم مثل أنزيم Lysozyme الذي يعمل على حماية الجهاز التناسلي وقتل الجراثيم الداخلة إليه .

وقد توجد أنواع أخرى من البكتيريا الهوائية و اللاهوائية الكروية Cocci والعصوية Bacilli كساكن طبيعي في اسفل الجهاز التناسلي الأنثوي .

الساكن الطبيعي في الجهاز التناسلي الذكري Male G.T Normal flora:

يتكون الجهاز التناسلي الذكري من الخصى Testes و البر بخ Epididymis و الناقل المنوي Vasdeferens والاحليل Urethra إذ أن جميع السابقة تعتبر معقمة sterile ما عدا مقدمة الاحليل التي تحتوي على عدد من البكتيريا التى تعتبر ساكناً طبيعياً فيه ، متضمنة أنواعاً من الساكن الطبيعي الموجود على الجلد والتي لا تشكل مصدرا للإصابة في الظروف الطبيعية منها.والجدول التالي يمثل أهم أنواع الساكن الطبيعي في الأحليل .

Coagulase-negative staphylococcus **Staph. aureus** **Diphtheroids** **Enterobateriaceae** **Mycobacterium smegmatis**	**Micrococci** **Sterptococcus Spp** **Non pathogenic Neisseria** **Mycoplasma Spp**

الساكن الطبيعي في الجهاز التناسلي الأنثوي Female G.T. Normal flora:

يعتبر الجهاز التناسلي الأنثوي اكثر تعقيداً من الذكري إذ يمكن تقسيم الإصابة فيه بين جزأين الجزء السفلي ويتضمن الفرج Vulva والمهبلVagina وعنق الرحم Cervix أما الجزء العلوي فيتضمن الرحم Uterus وأنابيب فالوب Fallopian tubes والمبايض Ovaries والتجويف البطني.Abdominal cavity حيث يكون الجزء العلوي معقماًsterile بينما يحتوي الجزء السفلي على كمية كبيرة من الساكن الطبيعي وتتضمن التالية:

Lactobacilli	Diphtheroids
Coag-Negative Staphylococcus	Bacteroides
Anaerobic Gram –positive cocci	Mycoplasma Spp
Anaerobic Gram –positive Rods	Moraxella
Gardenrella Vaginalis	أعداد قليلة من
Strep.agalactiae (gp.B streptococcus)	Enterobacteriaceae
Actenobacter	Yeast

و تعيش الأنواع السابقة بشكل طبيعي في المهبل وعنق الرحم ولا تُحدث الالتهابات ولكن عند انتقالها إلى الجزء العلوي من الجهاز التناسلي الأنثوي تصبح مصدراً للإصابة .

التهابات الجهاز التناسلي G.T infection :

تحدث الالتهابات في الجهاز التناسلي للإنسان من مصدرين رئيسيين هما:

أ- مصدر داخلي Endogenous

يؤدي انتقال الساكن الطبيعي في المهبل أو عنق الرحم أو الاحليل إلى مناطق أخرى من الجهاز التناسلي إلى حدوث الالتهاب.

ب- مصدر خارجي Exogenous

بحيث يكون مصدر الإصابة هنا كائن حي دقيق يأتي من خارج الجهاز التناسلي أي انه ليس من الكائنات التي توجد كساكن طبيعي في هذا الجهاز .

وتعتبر التالية من العوامل المهمة في حدوث التهابات الجهاز التناسلي .

أ - المعاشرة الجنسية :.

إذ تؤدي المعاشرة الجنسية إلى نقل الإصابة من شخص إلى آخر أو دخول الكائن الممرض إلى الجهاز التناسلي أثناء هذه العملية .

ب- العوامل الميكانيكية :.

مثل استخدام الماسحات swabs أو أدوات الفحص الأخرى وتعتبر عملية الولادة ظرفاً مناسباً لحدوث التهاب الجهاز التناسلي الأنثوي .

ج- الدورة الشهرية :

يكون المهبل وعنق الرحم في الوضع الطبيعي حامضي الوسط بسبب وجود الساكن الطبيعي البكتيري فيه إلا انه ونتيجة للدورة الشهرية يتغير PH إلى قاعدي مما يزيد الفرصة لحدوث الإصابة .

د- الحالة الفسيولوجية :.

قد يتعرض الجسم في بعض الحالات إلى نوع من تدني مناعته بسبب ما مما يؤدي ذلك إلى زيادة غير طبيعية في نوع من أنواع الساكن الطبيعي للجهاز التناسلي مسبباً حالةً من الالتهاب فمثلاً تزداد الفرصة للإصابة بالالتهابات في حالة الحمل كذلك فإن تناول بعض المضادات الحيوية بكثرة قد يؤدي إلى قتل بعض أنواع الساكن الطبيعي مما يغير الوسط في المهبل وعنق الرحم من حامضي إلى قاعدي مما يزيد من فرصة حدوث مايسمى بالتهاب المهبل البكتيري Vaginitis الذي تسببه أنواع من البكتيريا أو الفطريات التي تكون بالأصل موجودة بأعداد قليلة في نفس الموقع كساكن طبيعي Normal flora، وتعتبر الكائنات الحية الدقيقة التالية من اكثر مسببات التهابات الجهاز التناسلي:

Enterobacteriaceae	**Treponema pallidium**
Staph . aureus	**Chlamydia trachomatis**
Group B Streptococcus	**Haemophilus ducreyi**
Neisseria gonorrhoeae	**Herpes simplex virus**
Gardnella Vaginalis	**Candida albicans(yeast)**
Trichomonas Vaginalis	

إذ ترتبط الأنواع T.pallidium و C.trachomatis و H.ducreyi وHSV بتقرحات الجهاز التناسلي بينما ترتبط الأنواعand N.gonorrhoeae C.trachomatis بالتهابات الاحليل والرحم و أعلى الجهاز التناسلي أما التهاب المهبل البكتيري Vaginitis فيرتبط به الأنواع التالية T.vaginalis و Candida و Strep.agalactica و G.vaginalis و S.aureus وقد تسبب بعض أنواع الساكن الطبيعي في الجهاز التناسلي التهابات فيه نتيجة لأسباب متعددة كما ذكرنا سابقاً .

أما الانواع الجرثومية التالية فهي المسببات الشائعة للأمرض المنتقلة جنسياً :Sexually Transmitted Diseases

البكتيريا :

Haemophilus ducreyi	T.pallidum
N.gonorrhoeae	Chlamydia trachomatis
Mycoplasma homin	C. granulomatis

الفيروسات :

Papillomavirus	Herpes simplex virus
Hepatitis virus(B+C)	HIV virus

Pox virus

الطفيليات :

T. vaginalis , E. histolytica , Giardia lamblia

الفطريات : Candida albicans

طريقة جمع العينات Specimens Collection

تختلف طريقة جمع عينات التهابات الجهاز التناسلي وذلك حسب موقع الإصابة والمكان المراد اخذ العينة منه وهي تكون كما يلي :.

جمع العينات من الإناث Females.

اكثر العينات شيوعاً في الإناث هي مسحات اسفل عنق الرحم Endocervical swab إذ تؤخذ بمساعدة منظار مهبلي Speculum لتجنب تلوث الماسحة swab بالساكن الطبيعي لمنطقة المهبل Vagina وتعتبر هذه الطريقة غير فعالة لزراعة جرثومة السيلان ، وتؤخذ العينة كما يلي :.

1- ترطيب المنظارSpeculum بالماء الدافئ .

2- في حال وجود إفرازات زائدة يتم إزالتها بواسطة ماسحة swab ثم رمي الماسحة.

3- إدخال ماسحة swab (جديدة ومعقمة) حوالي 2-3 سم في عنق الرحم .

4- تحريك الماسحة بشكل دوراني لحوالي 5-10 ثوان حتى تمتص جزأ من الإفرازات .

5- وضع الماسحة في وسط نقل Transport media أو التعامل معها مباشرةً ويفضل في حالة البحث عن الكلاميديا Chlamydia اخذ كمية من الخلايا الطلائية epithilial cells مع الإفرازات من اجل عمل المسحة smear .

جمع العينات من الذكور Males

اكثر العينات شيوعاً في الذكور هي إفرازات الاحليل Urethral exudate في حال ظهور الإفرازات بكثرة ويمكن اخذ مسحة من الاحليل كما يلي :.

1- عند ظهور الإفرازات بكثرة يتم جمع قطرة واحدة في الصباح الباكر بواسطة ماسحة swab معقمة أو حلقة معدنية loop معقمة ثم تنقل مباشرة إلى الأوساط الزراعية أو إلى شريحة زجاجية لعمل مسحة smear .

2- في حالة قلة الإفرازات يتم إدخال ماسحة swab بعمق 2-3 سم في مقدمة الاحليل وتحريكها بشكل دائري .

3- يتم زراعة المسحة مباشرة أو وضعها في أوساط نقل خاصة .

ويمكن اخذ مسحات من اللوزتين أو القولون rectal swab من اللوطيين Homosexulas وفي المواليد الجدد الذين يحتمل انتقال الإصابة لهم من الأم وخاصة في حالة السيلان ،يمكن اخذ مسحة من إفرازات ملتحمة العينConJunctivla exudate .

كذلك يستخدم البول كعينة لتشخيص بعض التهابات الجهاز التناسلي إلا انه لا ينصح باستخدام راسب البول للكشف عن جرثومة السيلان وقد تستخدم أيضا إفرازات غدة البروستات Prostatic discharge بعد عمل المساج الشرجي anal massage للزراعة في حالة التهاب البروستات .

الحفظ والنقل Storage and Transport .

يجب فحص وزراعة عينات الجهاز التناسلي دائماً بسرعة ومباشرة بعد اخذ العينة من المريض بحيث يمكن أن تبقي عينات الجهاز التناسلي على درجة حرارة الغرفة لمدة 12 ساعة دون أن يحدث عليها أي تغير .وعند الحاجة لحفظ ونقل العينة بفضل وضعها في أوساط نقل وحفظ خاصة والتي منها :.

1- وسط Trans grow

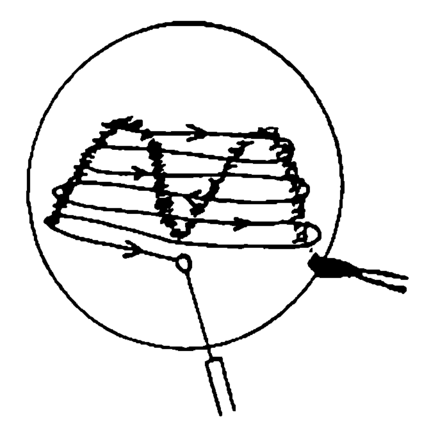
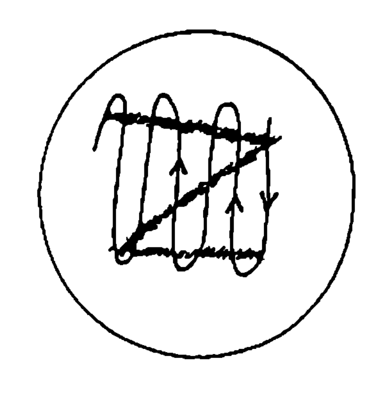
يعتبر هذا الوسط من اقدم أوساط الحفظ المستخدمة في هذا المجال إذ يتكون من وسط Modified Thayar-martin media (MTM) موضوع في عبوة زجاجية إضافة إلى نسبة منCO_2 بحيث يحافظ على بكتيريا Neisseria نشطة وجيدة إلا انه ينشط نمو البكتيريا الملوثة أيضا .

2- وسط JEMBEC

يعتبر هذا الوسط افضل من السابق لصغر حجمه وسهولة استخدامه ، ويستخدم لنقل وتنمية جرثومة السيلان إذ يتكون من صندوق بلاستيكي منبسط يحتوي على وسط MTM و وسط (Newyork City agar (NYC وأقراص مكونة من بيكربونات الصوديوم وحامض الستريك citric acid تعمل على توليد غاز CO_2.

حيث يتم زراعة العينة علية بواسطة تمرير الماسحة swab على سطح الوسط بشكل حرف(Z) أو(W) مع إدارة الماسحة أثناء الزراعة لنقل اكبر عدد من الجراثيم إلى الوسط ثم يتم عمل تخطيط عرضي بواسطة الحلقة المعدنية Loop.

ثم يتم حفظ الوسط في درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 18-24 ساعة قبل عملية النقل أو الزراعة ولقد تم تعديل مكونات هذا الوسط ليصبح اسمه وسط Gono-pak .ويعتبر هذان الوسطان مفيدين في حال وجود جرثومة السيلان.

طريقة زراعة عينات الجهاز التناسلي

3- وتستخدم أوساط أخرى لنقل وحفظ العينات مثل وسطي Amies وstuarts Transport media.

4- أما العينات التي يتوقع وجود Mycoplasma فيها فتحفظ في وسط مكون من trypticase soy broth و bovine albumin .

الزراعة والتشخيص Culture and Diagnosis

يفضل التعامل مع عينات الجهاز التناسلي مباشرة ويتم ذلك على عدة خطوات وهي كما يلي :

1- عمل مسحة smear من العينة ثم صبغها بصبغة غرام ويمكن الاستفادة من هذه التقنية في تشخيص عدة أنواع من البكتيريا وخاصة بكتيرياN.gonorrhoeae وبكتيريا Gardenrella vaginlis إذ يتم تمرير الماسحة swab على الشريحة الزجاجية بشكل دائري وبشدة ثم إجراء عملية الصبغ وتكون النتائج كما يلي:

أ- ظهور خلايا كروية سالبة لصبغة غرام مزدوجة الترتيب diplococcus داخل وخارج كريات الدم البيضاء pus cells دلالة على وجود بكتيريا N.gonorrhoeae.

ب- ظهور خلايا Clue cells دلالة على وجود بكتيريا G.vaginalis أحد مسببات التهاب المهبل البكتيري Bacterial Vaginitis وهي عبارة عن

خلايا طلائية من المهبل مغطلة ببكتيريا سالبة لصبغة غرام منحنية أو عصوية كروية coccobacilli مع غياب البكتيريا العصوية الموجبة لصبغة غرام .

ج-ويمكن مشاهدة أنواع أخرى من البكتيريا مثل S.aureas حيث تفضل إجراء الزراعة للإفرازات للتأكد من البكتيريا بشكل دقيق .

2-إجراء التحضير الرطب Wet mount للعينات : تعتبر هذه التقنية مفيدة في التعرف على مسبب الالتهابات الطفيلية و الفطرية مثل وجود طفيلي T.vaginalis وفطر Candida Spp إذ يتم عمل التحضير الرطب للكشف عن وجود الفطريات بإضافة 10% KOH إلى العينة لمشاهدة خلايا بيضوية متبرعمة budding yeast وخيوط فطرية hyphae ومشاهدة دلائل الالتهابات أيضا كوجود المخاط وكريات الدم البيضاء القيحية pus cells.

3- الزراعة Culturing : يتم زراعة عينات الجهاز التناسلي كغيرها من العينات للتعرف على الكائن الحي المسبب للالتهاب إذ يستخدم لهذا الغرض عدة أوساط هي :.

أ- يستخدم وسطي Blood agar و MacConkey أو EMB للتعرف على العديد من مسببات الالتهابات البكتيرية مثل S.aureus ومجموعة Enterobacteriaceae .

ب- وتستخدم عدة أوساط اختيارية لتنمية بكتيريا N.gonorrhoeae مثل وسط Thayar martein chocolate agar إذ يتم حضن هذه الأطباق على درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 24-48 ساعة وفي حال عدم ظهور النمو تحضن الأطباق لمدة 24 ساعة أخرى (72 ساعة) حيث يعتبر وسط MTM هو اكثر الأوساط شيوعا لتشخيص هذه البكتيريا وتستخدم أوساط أخرى لزراعة هذه البكتيريا مثل وسط (ML) Martin -Lews ووسط NewYork city agar.

ج- يتم زراعة العينات المحتوية على الفطريات على وسط SDA .

4- وتستخدم تقنيات أخرى لتشخيص مسببات التهابات الجهاز التناسلي وخاصة الأنواع التي لا تنمو على المزارع البكتيرية الروتينية فمثلاً .

أ- تستخدم المزارع النسيجية Tissue culture لتنمية وعزل العديد من المسببات مثل Chlamydia والفيروسات مثل HSV.

ب- تستخدم تقنية الحقل المظلم Dark-field technique لتشخيص البكتيريا المسببة لمرض الزهري (السفلس) Treponema pallidium .

ج- وتستخدم الفحوصات المصلية Serology بشكل عام للكشف عن وجود الكائن المسبب عن طريق الكشف عن وجود الأجسام المضادة التي كونها الجسم نتيجة للإصابة في الدم وتستخدم هذه التقنية غالبا للكشف عن الأمراض المنتقلة جنسياً Sexually Transmitted diseases .

التهابات الجهاز التنفسي

Respiratory Tract infections

مقدمة :

يقسم الجهاز التنفسي إلى قسمين علوي وسفلي إذ يشمل الجزء العلوي الأنف nose والفم mouth والبلعوم pharynx أما الجزء السفلي فيشمل باقي اجزاء الجهاز التنفسي .

ويكون الجهاز التنفسي معقماً عند الولادة وخلال ساعات تبدأ الأحياء الدقيقة بالدخول إليه مع التنفس ليتكون مجتمع الساكن الطبيعي فيه ، حيث تعيش فيه انواع عديدة من الأحياء الدقيقة كساكن طبيعي و بأعداد قليلة إلا أنها قد تصبح انتهازية وتسبب التهابات متعددة في حالات معينة .

ويحتوي الجهاز التنفسي على آليات عدة لتنقية الهواء وتقليل الجراثيم الداخلة إليه تبدأ بالشعيرات الموجودة في الأنف والإفرازات المخاطية المبطنة للأنف والفم التي تحتوي على أجسام مضادة مثل IgA وأنزيمات محطمة للجراثيم مثل أنزيم Lysozyme .

ويقل عدد الجراثيم كلما اتجهنا إلى اسفل الجهاز التنفسي إذ أن الأهداب والمخاط المبطن للقصبات الهوائية والأفعال المنعكسة مثل السعال والعطس جميعها تقلل الجراثيم الداخلة إلى القصبات فتبقيها شبه معقمة باستمرار وإذا ما تم وصول بعض الجراثيم إلى الحويصلات الهوائية alvolic فإن كريات الدم البيضاء الملتهمة Macrophage تعمل على التهامها والقضاء عليها .

ويساعد الساكن الطبيعي في الأنف والفم في منع التصاق الجراثيم المرضة في بطانة الجهاز التنفسي مما يقلل من احتمالية الالتهابات .

وتعتبر التالية من أهم الأحياء الدقيقة التي يمكن أن توجد في البلعوم الأنفي Nasopharynx والبلعوم الفمي Oropharynx كساكن طبيعي :

الساكن الطبيعي الذي نادراً ما يكون مرضاً RarelyPathogens	الساكن الطبيعي الذي يمكن أن يكون مرضاً Possible pathogens
Non hemolytic streptococci	Viridans streptococci
Micrococci	Group A Beta -hemolytic streptococci
Lactobacilli spp	Staph. aureus
Coagulase-Negative staphylococci	Streptococcus pneumonia
Staphylococcus spp	Acintobacter
Alpha hemolytic streptococci	Mycoplasma spp
Viellonella	Haemophilus influenzae
Spirochetes	Corynebacterium diphtheriae
Corynebacterium spp	Enterobacteriaceae
Neisseria spp	Klebsiella ozaenae
ما عدا (N.meningitidis و N.gonorrhoeae)	Peptostreptococcus spp
	Creptococcus neoformaus
	Filamentous Fungi
	Herpes simplex virns
	N.meningitidis
	Candida albicans
	H.para influenzae
	Moraxella catarralis
	Pseudomonas spp
	Bacteroides spp
	Actinomyces spp
	Eikenella corrodens
	Vibrio spp
	Mycobacterium spp

أما الكائنات الدقيقة التالية فهي تعتبر كائنات دقيقة مرضية للجهاز التنفسي Respiratory tract pathogens حيث أن وجودها بأعداد قليلة أو كثيرة في الجهاز التنفسي ذو دلالة مرضية مهمة لقدرتها العالية على إحداث المرض وهي تقسم كما يلي :.

الأحياء الدقيقة المرضة التي غالبا ما تسبب التهابات الجهاز التنفسي.	
M .tuberculosis	Corynebacterium diphtheriae
Mycoplasma pneumoniae	Neisseria gonorrhoeae
Chlamydia pneumoniae	Chlamydia trachomatis
Coccidiodes immitis	Bordetella pertussis
Histoplasma spp	Nocardia spp
Blastomyces dermatitides	Cryptococcus Neoformaus
	Many type of virus

الكائنات الدقيقة المرضة التي نادراً ما تسبب التهابات الجهاز التنفسي **Rare respiratory tract pathogens**	
Chlamydia psittaci	Francisella tularensis
Bacillus anthracis	Salmonella spp
Yersinia pestis	Coxiella burnetti
Klebsiella rhinoscleromatis	Pasteurella multocida
Pseudomonas pseudomallei	Parasites
Brucella spp	Varicella -Zoster virus

الباب الرابع

التهابات الجهاز التنفسي العلوي

Upper Respiratory tract infection

إن اكثر التهابات الجهاز التنفسي العلوي تظهر في منطقتي البلعوم الفمي والأنفي ويقل ظهور الالتهابات على جانبي التجويف الأنفي .

وتعتبر الفيروسات Viruses هي اكثر مسببات هذه الالتهابات إذ يبلغ نسبة الالتهابات الفيروسية حوالي 80% بينما تبلغ نسبة الالتهابات البكتيرية في البالغين حوالي 5-10% وفي الأطفال 15-20% ، من التهابات الجهاز التنفسي العلوي وتكون الالتهابات البكتيرية في الغالب تابعة لإصابة فيروسية أو تدني مناعة الشخص أو لأي سبب آخر قد يؤدي إلى تحطم النسيج الطلائي للتجويف الأنفي و الفمي كالتدخين مثلاً .

وتعتبر الأنواع البكتيرية التالية هي الأكثر شيوعاً كمسببات لالتهابات الجهاز التنفسي العلوي :

Streptococcus pyogenes (group A streptococcus)

β-hymolytic streptococci

Corynebacterium haemolyticum

بينما تعتبر التالية من الكائنات الدقيقة المرضة و التي نادراً ما تسبب التهابات الجهاز التنفسي العلوي .

Corynebacterium diphtheriae

Neisseria gonorrhoeae

Bordetella pertussis

إذ تسبب الأولى مرض الدفتيريا أما الثانية فتسبب التهاب البلعوم وتسبب الأخيرة السعال الديكي Whooping cough .

وكما أسلفنا فان الجهاز التنفسي العلوي يحتوي عدد كبير من الساكن الطبيعي مثل :.

Virdans streptococci	Beta-streptococci
Staphlococcus	anaerobic bacteria
Saprophtic Neisseria	Lactobacilli
Diphtheroids	Yeast
Haemophilus spp	

أما في المرضى المقيمين في المستشفيات hospitalized patients فان أفراد Enterobactriaceae وخاصةً Pseudomonas spp يمكن أن تصبح اكثر أفراد الساكن الطبيعي وجوداً في الجهاز التنفسي العلوي. وهنالك بعض أنواع البكتيريا القادرة على إحداث التهابات في الجهاز التنفسي السفلي أو الإصابة الجهازية Systemic infection فإنها قد توجد في الجهاز التنفسي العلوي دون أن تحدث إصابة ويسمي الأشخاص الذين يملكون هذه الأنواع في أعلى جهازهم التنفسي بالأشخاص الناقلين للبكتيريا Carrier ومن الأمثلة على هذه الأنواع البكتيرية :.

Streptococcus pneumonia

H.influenzae type b

N.meningitidis

وقد تحدث مضاعفات عدة لالتهابات الجهاز التنفسي العلوي بسبب انتقال البكتيريا أو سمومها إلى أماكن أخرى من الجسم مثل التهابات الأذن الوسطى وتسمم الدم والتهاب المفاصل وأغشية القلب .

جمع وحفظ عينات الجهاز التنفسي العلوي Collection of URT specimens :

يتم جمع العينات الدالة على التهاب الجهاز التنفسي العلوي من اللوزتين

والجدار الخلفي للتجويف الفمي وتعتبر مسحة اللوزتين Throat swab هي العينة الأكثر شيوعاً لتشخيص هذه الإصابة.

إذ تستخدم ماسحة swab مغطاة بالقطن أو بمادة الداكرون dacron أو بمادة calcium alginate إلا أن الأخيرة تعتبر مادة سامة للكلاميدياChlamydia ويتم اخذ المسحة بالطريقة التالية :.

1- إدارة وجه المريض باتجاه الضوء وجعل المريض يفتح فمه واسعاً .

2- يتم ضغط اللسان إلى الأسفل بشدة باستخدام ضاغط اللسان tongue depressor.

3- وباليد الأخرى تمرر ماسحة swab معقمة فوق اللسان باتجاه مكان الالتهاب دون أن تلامس اللسان أو تلامس أجزاء التجويف الفمي .

4- يتم ضغط وتدوير الماسحة على اللوزتين أو في مكان الالتهاب أو التقرح .

5- سحب الماسحة مع تجنب ملامسة اللسان أو الشفاه أو جدار الفم .

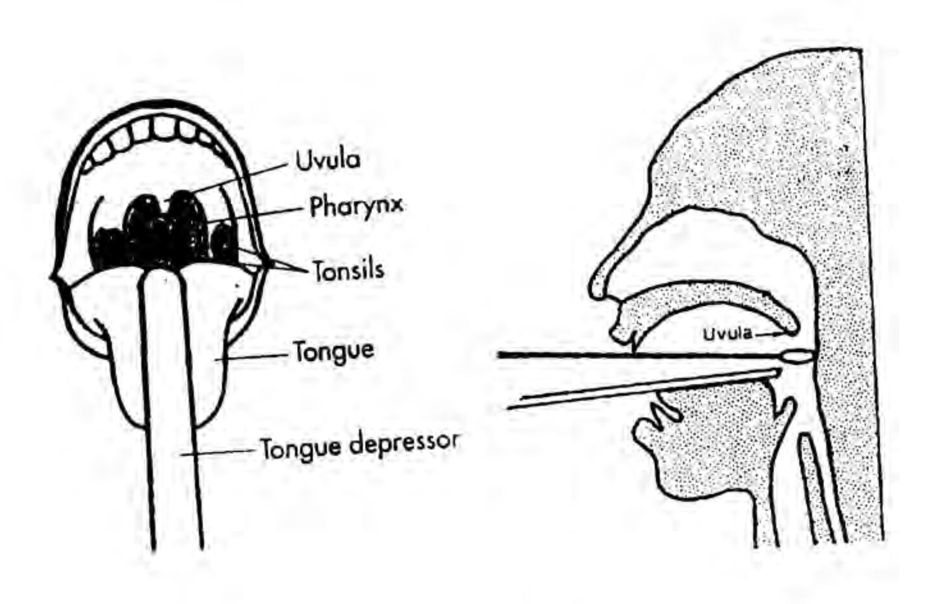
6- فحص المسحة مباشرة وزراعتها على أوساط ملائمة أو وضعها في وسط نقل إذا لزم الأمر وذلك بإدخال الجزء الأمامي منها داخل الوسط مع كسر جزئها الخلفي ثم إغلاق الوسط .

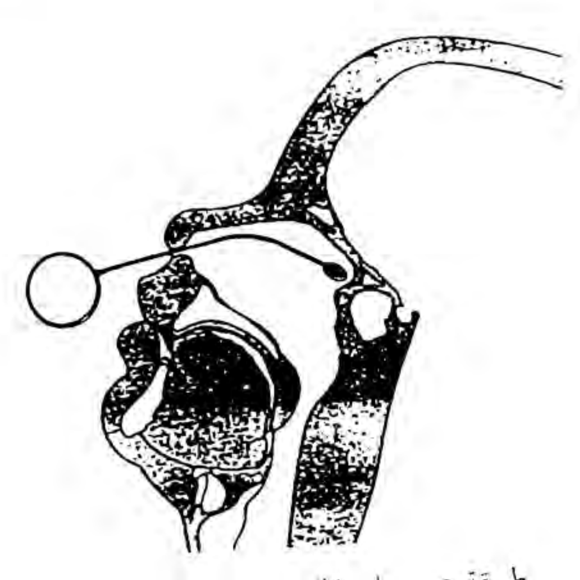
ويمكن أن تبقي الماسحة بما تحتويه من أحياء دقيقة على افضل وجه وهي رطبة لمدة 4ساعات من أخذها ما عدا group A streptococcus فهي تقاوم الجفاف وتبقي حية لمدة 48 ساعة على الماسحة swab .

أما في حالات تعذر فحص المسحة أو زراعتها مباشرة يفضل وضع الماسحة كما أسلفنا في وسط نقل خاص مثل وسط Stuarts Trausport media الذي يعتبر من افضل أوساط النقل المستخدمة لمثل هذه العينات إذ يحافظ على حيوية الأحياء الدقيقة في العينة ويثبط نمو الجراثيم الملوثة لها وقد تستخدم أوساط أخرى مثل وسط Amies charcoal T.M. أو وسط CharCoal -blood T.M. التي تستخدم لنقل العينات لأوقات قليلة نسبياً.

كما يمكن وضع الماسحة وخاصة المـأخوذة مـن التجويـف الأنفـي في أوسـاط تحتوي على البروتينات مثل وســط infusim broth ثـم وضعـها في الثلاجـة دون تجميد للحفظ .كذلك يمكن حفظ الماســحات swabs في الثلاجـة علـى درجـة 2-8 درجات مئوية لمدة 24 ساعة دون تجميد .

ويمكن أخذ العينات لتشخيص التهاب الجهاز التنفسي العلوي بطرق أخـرى غير المسحات مثل عمليـة غسـيل الأنـف Nasal washing إذ يتـم عمـل غسـيل للأنف بماء معقم وشفط السائل بواسطة أداة خاصة بذلك وتستخدم هـذه العمليـة عادة في حالات الإصابة بالسعال الديكي Whooping cough وقـد يتـم اسـتخدام ماسحة خاصة هنا تكون مرنة أو مائله تدخل في الأنف حتى تلامس جـدار البلعـوم أو مكان اخذ العينة .





طريقة جمع عينات الجهاز التنفسي العلوي

الزراعة وعزل المسبب للالتهابات Culture and Isolation :

يتم التعامل مع عينات الجهاز التنفسي العلوي بطريقتين رئيستين هما :.

1- الفحص المجهري Microscopic Examination :

يعتبر الفحص المجهري باستخدام تقنية الحقل المظلم أو الصبغ بصبغة غـرام لا قيمة له إلا في الحالات التالية :

- استخدام تقنية الحقل المظلـم في الكشـف عـن اللولبيـات المسبة لمـرض خنـاق فنسنت Vincents angina .
- استخدام التحضير الرطب مع 10% KOH للكشف عن الفطريـات في العينـة لمشـاهدة الأبـواغ والخيـوط الفطريـة خاصـة فطـر الكنديـدا Candida وفطـر Actenomyces كما أن الكشف بـالفحص المجـهري المباشـر عـن وجـود بعـض العصيات أو المكورات الموجبة لصبغة غرام لا يمكن من خلاله تأكيد التشـخيص وغالباً مـا تـؤدي إلى نتـائج خاطئـة إلا أن الفحـص المجـهري المباشـر قـد يزودنـا بمعلومات مهمة عن نوعية و كمية الجراثيم الموجودة في العينة بشكل طبيعي .

ويمكن الكشف عن وجود بعض الجراثيم في العينة مباشرة من خلال بعـض الفحوصات المصلية Serology أو التألقية المناعية Immuno florescent test الـتي يتم من خلالها الكشف عن الأجسـام المضـادة الخاصـة بـالنوع الجرثومـي في العينـة فمثلاً تبقي المسحة صالحة لمدة 24 ساعة للكشف عن انتيجينات بعض الفيروسـات فيها مباشرة .

2- الزراعة والتشخيص Culture and diagnosis :

تستخدم عدة أوساط لزراعة وتنمية الكائنات الدقيقة التي تسـبب التـهابات الجهاز التنفسي العلوي إذ يتم البحث عادة عن المسـببات الرئيسـية للالتـهابات في العينة . ومن المهم مراقبة السـاكن الطبيعي لهذا الجزء من الجسـم لأن هـذه المجموعـة يمكن أن تنتهز حالة ضعف الجسم وتدني في مناعته لتكون سبباً في حدوث الإصابة

ويفضل تكرار الزراعة للتأكد من ذلك م وتكون عملية الزراعة والتشخيص كما يلي :

1- يعتبر وسط اجار الدم Blood Agar وسطاً روتينياً لزراعة عينات الجهاز التنفسي العلوي بحيث يحتوي على 5% كريات دم حمراء من الخراف sheep أو غيرها من الحيوانات حيث يساعد هذا الوسط على نمو أنواع متعددة من البكتيريا وخاصة بكتيريا Streptococcus المحللة للدم من نوع بيتا -β hemolytic و يمكن من خلاله أيضاً تمييز البكتريا المحللة للدم عن غيرها من الأنواع .

وتتم الزراعة بعمل تخطيط واحد بالماسحة swab على الوسط ثم إكمال عملية التخطيط بواسطة الحلقة المعدنية loop ويحضن الوسط بعد ذلك على درجة 37 درجة مئوية لمدة يومين لمشاهدة النمو ، ويمكن أيضا استخدام وسط مفرق و خاص بزراعة مسحة اللوزتين Throat swab culture وهو عبارة عن وسط اجار الدم Blood agar مضاف له المضاد الحيوي sulfamethoxazole -trimethoprim (SXT) الذي يعمل على تثبيط ومنع نمو الساكن الطبيعي في التجويف الأنفي والفمي ويسمح فقط بنمو مجموعتي Streptococcus A+B.

ويمكن التعرف على مجموعة A وتفريقها عن مجموعة B من بكتيريا Streptococcus كما يلي :.

أ - زراعة العينة على وسط Blood agar لملاحظة مستعمرات صغيرة بيضاء محاطة بحلقة من تحلل الدم من نوع بيتا(β) وتكون سالبة لفحص Catalase .

ب- نشر مستعمرة مفردة على وسط آخر من Blood agar ثم وضع قرص من Bacitracin و SXT على الطبق وحضانة الوسط على درجة 35 درجة مئوية لمدة 24 ساعة إذ تعطي بكتيريا S .pyogenes (من مجموعة A Streptococcus) فقط حلقة تحلل (حساسية susceptibility)حول قرص Bacitracin بينما يظهر هذا النوع البكتيري مقاومة لقرص STX اذ يعتبر هذا الفحص مميزاً لهذه المجموعة .

ج- إجراء فحص (PYR) Pyrrolidonyl arylamidase الذي يشابه في نتائجه فحص Bactracin إلا أنه اكثر تخصصاً إذ تعطي بكتيريا S.pyogenens وبعض أنواع بكتيريا Beta –hemolytic Enterococci نتيجة إيجابية لهذا الفحص .

ء- ويستخدم بشكل شائع مجموعة من الفحوصات السريعة لتشخيص هذه المجموعة مثل فحص التخثر Latex agglutination وفحص ELISA ويمكن استخدام فحص CAMP للتمييز بين مجموعة A وB من بكتيريا Streptococcus إذ تعطي المجموعة B نتيجة إيجابية لهذا الفحص .

2- ولزراعة وتشخيص **مكورات السحايا Meningococci** يمكن أن نجري ما يلي :.

أ - زراعة العينة على وسط اجار الدم Blood agar ثم وضع الوسط في الحاضنة علي درجة 35 درجة مئوية في ظروف لاهوائية أو في ظروف هوائية مع وجود 5-10% ثاني أكسيد الكربون

ب- يمكن زراعة العينة على وسط(Modified-Thayer-martin (MTM ويمكن ايضا زراعة العينة على وسط chocolat agar مضافاً له بعض المضادات الحيوية مثل Vancomycin الذي يعمل على تثبيط نمو البكتيريا الموجبة لصبغة غرام والعصيات السالبة لصبغة غرام ثم يحضن الوسط لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 35-37 مْ.

ج-ويتم إجراء بعض الفحوصات البيوكيميائية على المستعمرات النامية بعد ذلك إذ تعطي هذه البكتيريا نتيجة إيجابية لفحص Oxidase وتعمل على تخمير سكري الجلوكوز والمالتوز، ويمكن استخدام فحص التخثر Latex agglutination أيضا للتعرف على هذه البكتيريا .

3- ولتنمية بكتيريا **الدفتيريا C .diphtheria** . تزرع العينات على وسط مثل وسط Loefflers slant أو وسط Cystein-tellurte agar ويستخدم فحص Elek tset لتمييز بكتيريا الدفتيريا عن غيرها من أنواع البكتيريا استناداً على إفرازها للسموم .

4- ولتشخيص وزراعة البكتيريا المسؤولة عن **السعال الديكي** فيتم زراعة العينة على أوساط مثل وسط Regan Lowe charcol agar أو وسط Bordet-Gengou media ويستخدم الفحص التألقي المناعي المباشر Direct Fluorescent antibody(DFA) test للكشف عن البكتيريا في العينة أو على الوسط مباشرة .

5- وتزرع العينة على وسط chocolate agar أو وسط اجار الدم Blood agar مضافاً إليه عاملي X وV ويحضن بوجود 5-10% CO_2 لتشخيص بكتيريا **Haemophilus** .

6- يمكن حقن أوساط مثل EMB و MacConkey بالعينة لعزل البكتيريا السالبة لصبغة غرام وعند توقع وجود **الفطريات** تحقن العينة في وسط SDA .

7- تزرع العينات لعزل **الفيروسات أو الكلاميديا** في مزارع نسيجية خاصة Tissus culture وتستخدم الفحوصات المصلية عادة لتشخيص الإصابة بالنوعين السابقين من الأحياء الدقيقة .

8- ولتحديد الأشخاص الناقلين للبكتيريا Carrier تؤخذ مسحة swab من الأنف وتزرع على عدة أوساط لتشخيص وجود البكتيريا محمولة في جهازهم التنفسي العلوي .

9- يجب إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية على نتيجة الزراعة وخاصة في حال نمو أحد الأنواع المرضة على الأوساط الزراعية ويعتبر البنسلين Penicillin G افضل المضادات الحيوية لعلاج التهابات اللوزتين البكتيري يتبعه في ذلك الأنواع tetracycline أو Erythromycin أو Bacitracin .

الباب الخامس

التهابات الجهاز التنفسي السفلي

Lower Respiratory Tract infection

مقدمة :

يتكون الجزء السفلي من الجهاز التنفسي من الرئتين Lungs والقصبات bronchi وقد تصاب هذه الأجزاء بالتهابات متعددة تسببها البكتيريا أو الفيروسات أو الفطريات أو غيرها من الأحياء الدقيقة .إذ يعتبر الجزء السفلي معقماً بسبب العوامل المناعية العامة الموجودة في الجهاز التنفسي العلوي والقصبات والتي تعمل على قتل ومنع الجراثيم من الدخول إلى الرئتين مع الهواء وهي كما أسلفنا سابقاً الشعيرات الأنفية و الإفرازات المخاطية والأهداب الموجودة في القصبات وكريات الدم البيضاء الملتهمة Macrophages بالإضافة إلى الأفعال المنعكسة مثل العطس و السعال جميعها تساعد في بقاء القصبات و الرئة في حال معقمة .

إلا أن أي جرثومة تستطيع التغلب على العوامل المناعية السابقة وتخترقها وصولاً إلى الرئة قد تؤدي إلى التهابات متنوعة في القصبات Bronchitis أو في الرئة Pneumonia إذ أن اغلب مسببات التهابات الرئة والقصبات هي من الأنواع الموجودة في الجهاز التنفسي العلوي كساكن طبيعي و التي استطاعت المرور إلى اسفل الجهاز التنفسي وذلك نتيجة لتدني مناعة الشخص لأي سبب ممكن .

وقد تكون التهابات الجهاز التنفسي السفلي في الإنسان السليم ناتجة مباشرة من أنواع بكتيرية شديدة الامراضية لذلك تسمى Primary pneumonia أما الالتهابات البكتيرية الناتجة بعد التهابات فيروسية فتسمي Scondary pneumenia وقد ترتبط أنواع أخرى من البكتيريا بالتهابات لدي الأشخاص المصابين بأمراض تؤدي إلى تدني مناعة أجسامهم أو المرضى المقيمين في المستشفيات وسنذكر لاحقاً أهم الأنواع البكتيرية المسببة لالتهابات الجهاز التنفسي السفلي .

1- الأنواع البكتيرية المرتبطة بإصابة الأشخاص السليمين مباشرة primary pneumonia والتي يؤدي وجودها بكميات قليلة إلى حدوث الالتهاب.
Streptococcus pneumonia Mycoplasma pneumonia Chlamydia pneumonia Mycobacterium tuberculosis Legionella pneumophila

2- الأنواع البكتيرية المرتبطة بالتهابات الجهاز التنفسي السفلي والتابعة عادة لالتهاب فيروسي
Haemophilus influenzae Staphlococcus aureus Niesseria meningitidis Moraxelle catarrhalis Fungi

3- أنواع البكتيرية التي تصيب الأشخاص منخفضي المناعة Immuno compromised patient
Klebsiella pneumonia Pseudomonas aeruginosa Serratia spp Staph.aureus مجموعة Enterobacteriaceae

جمع العينات Specimens Collection :

يمكن اخذ علة عينات مناسبة للزراعة لتشخيص التـهابات الجـهاز التنفسـي السفلي وهي :.

1- البلغم Sputum :

يعتبر البلغم هو العينة الأكثر شيوعاً واستخداماً لتشخيص التهابات الجـهاز التنفسي السفلي ويتم جمع العينة بالتنسيق مع المريض ليعطـي العينـة مـن أعمـاق الرئة بواسطة السعال العميق Deep cough ثم وضع العينـة في عبـوة معقمـة .مـع مراعاة عدم اختلاط البلغـم باللعـاب saliva حتـى لا يتلـوث بالسـاكن الطبيعـي الموجود في الفم ، ويفضل اخذ عينة البلغم من المريض قبل تناول المضادات الحيويـة وفي الصباح الباكر قبل الأفطار .اذ يتراوح حجم عينة البلغم المناسبة للزراعة ما بين 1-3 ملم حيث يفضل إعطاء 3-6 عينات خاصة في مرض السـل لزيـادة احتماليـة عزل البكتيريا المسببة للمرض .

ويمكن حفظ العينة في الثلاجـة أونقلها في صندوق مـبرد علـى درجـة حـرارة 2-8 درجات مئوية لفترة لا تزيد عن 3 ساعات ، اذ يفضل فحـص وزراعـة العينـة مباشرة .

أما المرضى اللذين يصعب عليهم إعطاء البلغم فيتم إجـراء معالجـة تنفسـية لهم بحيث يتم إعطـاؤهم محلـول ملحـي فسـيولوجي أو مـادة مذيبـة للمخـاط مثـل N - acetyl - L -cysteine (NALC) مع NaOH 20% لمـدة 15 دقيقـة بطريقـة الأستنشاق والتي تساعد المريض على إعطـاء البلغـم وتعمـل علـى التخلـص مـن الساكن الطبيعي البكتيري الملوث للعينة.

ويمكن اخذ العينة من الجهاز التنفسي السفلي بعلة طرق أخرى يتم من خلالها تجنب تلوث العينة بالساكن الطبيعي للجهاز التنفسي العلوي وهي كما يلي:

أ- Endotracheal aspiration السحب من اسفل القصبات :

وتتم عملية السحب من اسفل القصبات عن طريق إدخال أنبـوب مطـاطي

إلى داخل القصبات وسحب الإفرازات الموجودة فيها من اجل زراعتها ، وتستخدم هذه الطريقة للحصول على العينة من الأطفال الصغار أو من المرضى غير القادرين على إعطاء العينة بواسطة السعال ، ويمكن إجراء غسل للقصبات Bronchial washings بواسطة كمية من المحلول الملحي Normal saline ثم سحب السائل الناتج والمختلط مع إفرازات القصبات من اجل الزراعة .

ب- غسل القصبات والحويصلات الهوائية (Bronchalveolar Lavage (BAL .

إذ تتم هذه العملية بواسطة منظار خاص حيث يتم ضخ اكثر من 50 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي في اسفل القصبات ثم يجمع هذا المحلول مرة أخرى من اجل الزراعة .

ج- الخزعة أو السحب المباشر Direct Needle aspiration or Biopsy .

تستخدم هذه الطريقة لتجنب تلوث العينة بالساكن الطبيعي الموجود في الفم ولتشخيص الالتهابات البكتيرية اللاهوائية أو الانتهازية .

يمكن استخدام السائل المأخوذ من المعدة بواسطة عملية الشفط Gastric aspiration وخاصة في المواليد الجدد لتشخيص الإصابة بالسل إذ تكون البكتيريا قد نزلت إلى المعدة أثناء الليل ، لذلك يفضل أن تتم هذه العملية في الصباح الباكر.

فحص عينات الجهاز التنفسي السفلي Examination of L.R.T specimen:

تخلط عينة البلغم مع 10% NaOH للتخلص من المخاط ثم تركز بعملية الطرد المركزي وبعد ذلك تفحص باتباع الخطوات التالية :.

1- الفحص الظاهري Macroscopic Examination :

في هذا الفحص يتم معرفة قوام ولون ورائحة العينة حيث يعطي دلالة تشخيصية معينة فمثلاً وجود الرائحة النتنة للبلغم دلالة على وجود التقرحات الناتجة من بكتيريا لاهوائية ولون البلغم الأحمر دلالة على وجود الدم فيه .

2- الفحص المجهري المباشر Direct Microscopic Examination :.

أ- التحضير الرطب Wet mount :

يتم عن طريق التحضير الرطب مشاهدة بعض الطفيليات أو الفطريات المسببة للألتهاب أو كريات الدم البيضاء القيحية Pus cells في العينة والتي تعتبر دليلاً على وجود الألتهاب .

ب- صبغة غرام Gram stain :

يتم إجراء صبغة غرام لمسحة Smear من عينة البلغم للتعرف على وجود البكتيريا وكريات الدم البيضاء والحمراء والخلايا الطلائية ، فعلى سبيل المثال عند ظهور بكتيريا كروية مزدوجة موجبة لصبغة غرام فان ذلك يدل على وجود بكتيريا Strep.pneumonia .

ويمكن من خلال المسحة المصبوغة بصبغة غرام التأكد من وجود الالتهاب ومن صحة العينة ويكون ذلك اعتماداً على نوع الخلايا الموجودة في المسحة وهي كالتالي :

- كريات الدم البيضاء متعددة الانوية PMN والتي تظهر في حالة وجود الالتهابات .
- خلايا طلائية حرشفية Squamous epithelial cells وهي خلايا تغلف التجويف الفمي ووجودها دليل على تلوث العينة باللعاب .
- خلايا طلائية عمادية مهدبه Ciliated columnar epthelial cells وهي خلايا تغلف القصبات الهوائية ووجودها دليل على التهاب في القصبات الهوائية .

ان وجود الخلايا الطلائية الحرشفية والبكتيريا فقط في المسحة المصبوغة ليس دليلاً أكيداً على الالتهاب بينما احتواء عينة البلغم على كريات دم حمراء وكريات دم بيضاء متعددة الانوية PMN وبكتيريا داخل الخلايا Intracellular bacteria فان هذا قد يدل على وجود التهاب الجهاز التنفسي السفلي .

وقد أشار بعض العلماء في دراساتهم على أن وجود اكثر من 10 خلايا طلائية في المسحة المصبوغة تحت القوة الكبرى للمجهر 100X يدل على تلوث

العينة باللعاب إذ ينصح برفض العينة ، أما إذا ظهرت اكثر من 25 كرية دم بيضاء واقل من 10 خلايا طلائية في حقل المجهر على القوة الصغرى 10X فانه دليل على الالتهاب ويتم تأكيد ذلك بعملية الزراعة .

ج- للكشف عن بكتيريا Strep.pnumonia في العينة مباشرة يتم إجراء فحص الانتفاخ Swelling Test.

د- تحضير مسحة وصبغها بصبغة Ziehl-Nleesen stain للكشف عن بكتيريا السل M.tuberculosis .

هـ - ويفيد صبغ العينة بصبغة جمسا Giemsa في الكشف عن بعض الفطريات مثل فطر Histoplasma .

و - إجراء بعض الفحوصات المصلية على عينة البلغم مباشرةً مثل الفحوصات التالقية المناعية Immuno fluorescent assay أو فحوصات التخثر للكشف عن انتيجينات بعض أنواع البكتيريا مثل Mycoplasma أو Legionella أو Chlamydia .

الزراعة Culturing :

أ- تزرع عينة البلغم بشكل روتيني على الأوساط التالية Blood agar و Chocolate agar ويمكن أن تزرع على أوساط اختيارية مثل MacConkey agar وEMB اذ تم مشاهدة بكتيريا عصوية سالبة لصبغة غرام ، وتعتبر الأوساط السابقة مفيدة في عزل معظم البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام .

ب- يستخدم وسط Lowenstein – Jensen agar كوسط مناسب لزراعة العينة التي يشتبه بوجود بكتيريا السل .T.B فيها إذ يتم خلط البلغم مع مادة NALC و NaOH لمدة 15 دقيقة إذ تعمل NaOH على إذابة المخاط في وتعمل مادة NALC على قتل الساكن الطبيعي الملوث للعينة دون أن يؤثر ذلك على بكتيريا السل ذات المقاومة العالية للأحماض ، ثم يتم تركيز العينة بجهاز الطرد المركزي وزراعتها على الوسط المذكور سابقاً

ج- تزرع العينة المشتبه بوجود الفطريات فيها على أوساط مثل SDA أو (BHI) Brain-heart infusion agar .

ء- تزرع العينات المحتوية على الفيروسات والكلاميديا في المزارع النسيجية Tissue culture .

ويتم تشخيص الكائن المسبب للألتهاب عن طريق دراسة المستعمرات النامية على الوسط بواسطة اجراء صبغة غرام، الفحوصات البيوكيميائية والفحوصات المصلية .

ويمكن التمييز بين S.pneumonia عن غيرها من أنواع Streotococcus بواسطة فحص Optochin إذ أن S.pneumonia تكون حساسة لهذا الفحص بينما الأنواع الأخرى من نفس البكتيريا تكون مقاومة له .

الباب السادس

السائل النخاعي الشوكي

Cerebral spinal fluid (CSF)

يتكون الجهاز العصبي المركزي CNS من الدماغ و الحبل الشوكي و الأغشية المحيطة بهما والتي تسمى السحايا meninges ويحاط هذا الجهاز بسائل يسمى السائل النخاعي الشوكي CSF الذي يتم إفرازه من الأوردة المحيطة بالدماغ إذ يفرز 95% منه من البطينات الدماغية الجانبية Ventricles ويتجه الى الفراغ تحت العنكبوتي Sub-archnoid space ليملأه ويحيط بذلك بالجهاز العصبي المركزي كاملاً ثم يعود الى الدم بشكل دورة مستمرة .ويعتبر السائل النخاعي الشوكيCSF سائلاً معقماً لا لون له ولا رائحة يبلغ حجمه في الأنسان البالغ ما بين 90-150 مل و في المواليد الجدد و الاطفال ما بين 10-60 مل . إذ يعمل بالتعاون مع أغشية السحايا على وقاية الجهاز العصبى المركزي من الصدمات والأحتكاك مع عظام الجمجمة والعمود الفقري كذلك يعمل CSF على ايصال العناصر الغذائية الى أنسجة الجهاز المركزي ويخلصها من الفضلات ويحتوي CSF على مواد كيميائية تختلف في تركيزها عن باقي سوائل الجسم . فمثلاً يكون تركيز السكر فيCSF حوالى 60% -80% من تركيزه بالدم أي حوالي ثلثي تركيز السكر في الدم (والتي تساوي في العادة 45-85mg/dl) أما نسبة البروتين فيه فتتراوح بين 15-45mg/dl ويكون CSF في العادة خالياً من كريات الدم البيضاء وقد يحتوي أحياناً في الوضع الطبيعي على حوالي 1-6 كريات دم بيضاء لمفية Lymphocyte لكل مليمتر واحد من السائل .

التهاب السحايا Meningitis :

تتعرض أغشية السحايا و النسيج العصبي المركزي إلى التهابات متعددة

نتيجة للعديد من الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا و الفيروسات و الفطريات بالأضافة إلى العديد من الطفيليات التي تنتقل عبر الدم من أماكن متعددة من الجسم إلى CSF ثم تصل أغشية السحايا أولاً وقد تصيب أجزاء اخرى من النسيج العصبي ونتيجة لقلة الخلايا الملتهمة phagocytes والأجسام المضادة في السائل النخاعي الشوكي تزداد فرصة انتقال الجراثيم من الدم اليه كنوع من الهروب من مناعة الجسم ومن أجل ايجاد مكان مناسب للتكاثر وتعتبر الأنواع البكتيرية المكونة للمحفظة capsule أكثر أنواع البكتيريا إحداثاً لالتهابات السحايا إذ تساعدها المحفظة على مقاومة عملية الالتهام Phagocytosis وتعتبر الالتهابات القريبة من الجهاز العصبي المركزي من أهم مصادر التهابات السحايا مثل التهابات اللوزتين و الأذن الوسطى .

ويقسم التهاب السحايا meningitis الى نوعين : حاد acute ، ومزمن chronic حيث يرتبط التهاب السحايا البكتيري الحاد Acute Bacterrial meningitis بأعراض مثل الحمى وألم في الرأس وتقيؤ وشد عضلي في الرقبة وقد لا تظهر هذه الاعراض في الأطفال حديثي الولادة وقد تكون الأعراض على شكل ضعف وهبوط عام وتقيؤ وتشنجات عند بعضهم وتسبب الفيروسات التهاباً مشابهاً للالتهاب البكتيري من حيث الأعراض ويطلق على التهاب السحايا الفيروسي أو أي التهاب سحايا غير بكتيري اسم Aseptic meningitis .

وتعبر التالية من أهم مسببات التهابات السحايا الحاد :-

المسببات البكتيرية	المسببات غير البكتيرية
N.meningitidis	Strongyloides stercoralis
Strep.pneumonia	Cryptococcus neoformans
Group B streptococcus	Virues
Listeria monocytogenes	Toxoplasma gondii
S.aureus	Naegleria
E.Coli and Gram (-ve)bacilli	Candida
Leptospira	E. histolytica
T.pallidum	
M.tuberculosis	

أما الأنواع التالية فقد عزلت من التهابات السحايا المزمنة Chronic.	
Actinomyces	M.Tuberculosis
Brucella	C.Neoformans
Shigella	Coccidiodes immitis
Nocardia	Histoplasma capsulatum
Toxoplasma gondii	Blastomyces dermatitidis
Paragonimus westermani	Candida spp
Trichinella spiralis	T.pallidum

وتعتمد الأصابة بالتهاب السحايا البكتيري على عوامل عدة تساعد في حدوث الالتهاب وتحدد نوع المسبب وهذه العوامل هي :

1- التشوهات الخلقية التشريحية anatomical abnormalities .

2- تدني المناعة بسبب الحالات المرضية .

3- غياب الاجسام المضادة الخاصة ببعض الانواع البكتيرية مما يترك الشخص عرضة للأصابة وخاصة في الاطفال الذين لا تزيد أعمارهم عن خمسة أعوام .

4- العمر age: نتيجة الدراسات المتعددة وجد ان هنالك انواعا معينة من البكتيريا تتكرر ضمن أعمار معينة وتكون هي المسبب الاكثر وجوداً في نتيجة الزراعة .

فمثلاً تسبب الأنواع S.pneumonia و N.meningitidis و H.influenzae أكثر من 80% من حالات التهاب السحايا البكتيري عند الأطفال اما الجزء الباقي من الحالات 20% فتسببه أنواع اخرى من البكتيريا الانتهازية مثل L.monocytogenes والعصيات المعوية السالبة لصبغة غرام و Staphylococcus و Streptococcus spp وغيرها من أنواع البكتيريا .وقد صنفت المسببات الأكثر تكراراً بالارتباط مع العمر كما في الجدول التالي:

المواليد الجدد Neonatal العمر:(أقل من شهر)	الأطفال InFants (شهر الى 5سنوات)	الأطفال والبالغين (أكبر من 5 سنوات)
Group B streptococcus E.cali L.monocytogenes Klebsiella spp Group D streptococcus	S. pneumonia N. meningitidis H. influenzae Type b	S. pneumonia N. meningitidis

جمع ونقل العينات Collection and Transport of CSF :

يعتبر السائل النخاعي الشوكي هو العينة المخبرية الرئيسية في تشخيص التهابات السحايا إذ تعطي مكوناته الخلوية والكيميائية دلائل مهمة على الاصابة .

وكما أسلفنا فإن السائل النخاعي الشوكي الطبيعي معقم وصافي وقد يحتوي على كريات دم بيضاء لمفية يتراوح عددها ما بين 1-6 خلايا لكل سنتيمتر مكعب منه. وتتغير مكونات CSF الكيميائية والخلوية مع التهاب السحايا ففي التهاب السحايا البكتيري الحاد مثلاً يصبح CSF متقيحاً purulent نتيجة لوجود عدد كبير من كريات الدم البيضاء ويرتفع تركيز البروتين ويقل تركيز السكر فيه .

ويتم جمع عينة CSF من قبل الطبيب المختص بواسطة عملية البزل Aspiration بإدخال ابرة خاصة بين الفقرتين القطنيتين الرابعة والخامسة(Lumbar puncture) حتى تصل الى السائل النخاعي لسحبه . وتتم هذه العملية تحت ظروف معقمة اذ يتم سحب 2-5 مل من CSF وتوزع على ثلاث أنابيب معقمة ونظيفة ومحكمة الأغلاق بمقدار (1-2) مل من CSF في كل أنبوب وترقم الأنابيب بالتتابع من 1-3 اعتماداً على عملية السحب .ليتم استخدام أحد الأنابيب من أجل الزراعة و الفحوصات الجرثومية Microbiology و الآخر للفحوصات الكيميائية Chemistry و الثالث من أجل القيام بفحوصات الدم (عد الخلايا) Hematology حيث يشترط أن لا يكون الأنبوب الأول هو المستخدم للزراعة وذلك لاحتمال تلوثه بالبكتيريا الموجودة كساكن طبيعي على الجلد أثناء بدء عملية السحب . و يفضل اجراء الفحوصات على عينة CSF بشكل مباشر خلال أقل من ساعة من أخذ العينة بسبب حساسية الجراثيم المسببة لالتهاب السحايا للهواء والبرودة خاصة بكتيريا Neisseria و Haemophilus .لذلك تحفظ عينة CSF على درجة حرارة الغرفة أو في الحاضنة على درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 2-3 ساعات فقط ولا تحفظ في الثلاجة .اما العينات التي تحتوي على الفيروسات فيمكن حفظها في الثلاجة لمدة 24 ساعة أو حفظها على درجة حرارة 70 تحت الصفر لفترات زمنية طويلة .

المراحل المتبعة في فحص السائل النخاعي الشوكي :

تمر عملية فحص السائل النخاعي الشوكي بعدة خطوات مهمة لتشخيص الكائن المسبب لالتهاب السحايا وتعطي هذه الخطوات دلالات مهمة على نوع الالتهاب ويكون ذلك كما يلي :.

أولا: الفحص الظاهري Macroscopic examination :.

يكون السائل النخاعي الشوكي في الحالة الطبيعية عديم اللون رائقاً وعند الأصابة بالتهاب السحايا فإن ذلك يتغير ويكون الفحص الظاهري بملاحظة ما يلي:

1- العكورة Turbidity :.

يصبح CSF عكراً نتيجة لوجود عدد كبير من كريات الدم البيضاء القيحية Pus cells فيه الذي يعتبر دليلاً على الإصابة إلا أنه قد يكون CSF رائقاً إذا تمت عملية السحب في مراحل مبكرة من الإصابة .

2-اللون Color :

ظهور اللون الأحمر في العينة (لون الدم) دليل على نزف في الأغشية السحايا أو نزف دماغي أو نتيجة لتمزق أحد الأوعية الدموية الدقيقة اثناء عملية سحب السائل ، وعند ظهور اللون الأحمر في الأنبوب الأول فقط فهذا دليل على تمزق أحد الأوعية الدموية الدقيقة أثناء عملية سحب العينة أما إذا كانت شدة اللون في الانابيب الثلاثة متساوية فهذا دليل على النزف في الدماغ أو في أغشية السحايا إذ لابد من ذكر ذلك في تقرير المختبر

وقد يظهر CSF بلون وردي وهذا دليل على وجود صبغة Xanthochromia الناتجة من تحلل الدم وخروج الهيموغلوبين من الكريات إذ يبدأ ظهور هذه الصبغة بعد حوالي أربع ساعات من بداية النزف و تبدأ بالإختفاء بعد 4-8 أيام منه ويجب الكشف عن هذه الصبغة في اقل من ساعة بعد أخذ العينة حتى لا يحدث تحلل لكريات الدم الحمراء التي قد توجد في العينة وبالتالي الحصول على نتيجة إيجابية خاطئة إذ أن ظهور الصبغة دليل على وجود النزف القديم نسبياً في منطقة الدماغ

أو اغشية السحايا . أما ظهور اللون الأصفر في عينة CSF فهو دليل على وجود مادة البليروبين Bilirubin الناتجة أيضاً من تحلل كريات الدم الحمراء والتي تظهر بعد حوالي 12 ساعة من النزف وتختفي بعد حوالي 2-4 أسابيع وقد يؤدي ارتفاع نسبة البروتين اكثر من 150mg/dl في العينة الى ظهور اللون الاصفر أيضاً .

3- ملاحظة وجود الجلطات clots والترسبات deposit :

قد تظهر التجلطات نتيجة لزيادة نسبة الفيبرينوجين Fibrinogen في العينة أثناء سحبها وظهور الجلطات clots قد يترافق مع إنسداد التجويف تحت العنكبوتي Sub arachnoid space أو التهاب السحايا .ونتيجة لاحتواء الجلطات clots على كمية من البكتيريا وكريات الدم البيضاء ينصح بأخذ الجلطة ووضعها على شريحة زجاجية نظيفة حتي تجف ، وبعد ذلك تخلط مرة أخرى مع سائل CSF ثم يتم ترسيب العينة بجهاز الطرد المركزي لاستخدام الراسب في التحضير الرطب أو المسحات المصبوغة فقط .

ثانيا:الفحص المجهري المباشر Direct Microscopic examination :.

يمر الفحص المجهري لعينة CSF بعدة خطوات متسلسة جميعها يساعد في تشخيص وتحديد نوع الإصابة وتكون هذه الخطوات كما يلي :.

1- عد الخلايا Cell count :

تعتبر عملية عد كريات الدم البيضاء من أسرع الفحوصات التي يجب إجراؤها على عينة CSF إذ يجب ان تتم بسرعة وفي وقت لا يتجاوز النصف ساعة من أخذ العينة بحيث تعطي عملية عد الخلايا مؤشراً على الإصابة وكما أسلفنا فإن CSF في الوضع الطبيعي يحتوي على أقل من ست خلايا لمفية لكل ملم واحد منه إلا أن زيادة العدد دليل على الإصابة بإلتهاب السحايا كذلك فإن CSF الطبيعي لا يحتوي على أية كرية دم حمراء أيضاً .وتتم عملية العد بإستخدام شريحة خاصة Chamber (نفسها المستخدمة لعد كريات الدم الحمراء والبيضاء في الدم) وذلك بأخذ جزء من سائل CSF مباشرة بعد تحريكه بلطف ووضعه على الشريحة ثم العد تحت المجهر وينصح بعدم عد الخلايا في عينة CSF آلياً .

2-تحضير المسحات Preperation of smear :.

يتم اجراء عملية الطرد المركزي على أحد الأنابيب المحتوية على العينة الطازجة لمدة 15 دقيقة على 300دورة بالدقيقة ثم فصل الجزء الطافي لاستخدامه في فحوصات اخرى وأخذ نقطة من الراسب ووضعها على شريحة زجاجية نظيفة دون نشر النقطة ثم تركها لتجف ثم صبغها ،أما في حالة كون العينة CSF عكرة فيمكن تحضير المسحة مباشرة دون عملية الطرد المركزي ويفضل تحضير عدة مسحات معاً من أجل عمل ما يلي :.

أ -العد التفريقي لكريات الدم البيضاء Differential cell count :.

إذا كان عدد كريات الدم البيضاء في عملية العد السابقة أكثر من 30 خلية يتم اللجوء الى عملية العد التفريقي من أجل تحديد النسبة المئوية لكريات الدم البيضاء في العينة بحيث يتم عد مئة كرية دم بيضاء ثم حساب النسبة المئوية لكل نوع منها تحت المجهر .

ويشير ارتفاع نسبة الكريات متعددة الأنوية Polynuclear cells الى الإصابة البكتيرية بينما يشير ارتفاع نسبة الكريات وحيدة النواة Mononuclear cells الى الإصابة الفيروسية .وتصبغ المسحة هنا بالصبغات الخاصة بالعد التفريقي مثل صبغة رايت Wright أوصبغة جمسا Geimsa .

ب-صبغة غرام Gram stain :.

تصبغ أحد الشرائح بصبغة غرامgram stain بأسرع وقت ليتم مشاهدة المسحة تحت العدسة الزيتية للمجهرOil immersion ثم تزويد الطبيب بالنتيجة بسرعة بحيث تعتبر هذه النتيجة مبدئية ومؤكدة للإصابة البكتيرية إذ تظهر المكورات السحائية meningo cocci على شكل خلايا مزدوجة diplococci سالبة لصبغة غرام داخل خلوية intracellulal وتظهرS.pneumonia بشكل الشفرة Lancet shape مزدوجة موجبة لصبغة غرام داخل وخارج خلايا الدم البيضاء أما ظهور عصيات صغيرة سالبة لصبغة غرام فقد تدل على بكتيريا H. influenzae أو أحد أفراد العائلة المعوية Enteric negative rods و تستخدم صبغة غرام للكشف عن

معظم أنواع البكتيريا الشائعة والمسببة لالتهاب السحايا ما عدا L.monocytogenes.

ج-عمل مسحة مصبوغة بصبغة Ziehl-Neelsen stain :

يتم عمل هذه المسحة عند الشك بوجود بكتيريا M. Tuberculosis في العينة إذ تعطي هذه المسحة نتيجة سريعة مقارنةً مع عملية الزراعة التي تأخذ مدة زمنية طويلة.

د- عمل مسحة وصبغها بصبغة Methylene blue :.

تستخدم هذه الصبغة بسبب قابليتها الضعيفة على صبغ خلفية الجزيئات إذ تعطي القدرة على المقارنة بين الأنواع البكتيرية الموجودة في العينة وبين خلفية الشريحة back ground وأكثر ما تكون هذه الصبغة مفيدة في حالة وجود الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام .

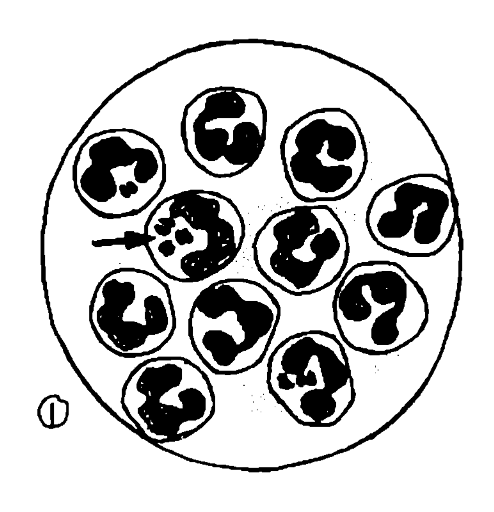
هـ- الصبغ بالصبغات التألقية Fluorochrom stain :.

تستخدم هنا الصبغات التألقية مثل Acridine orang وauramin rhodamine للحصول على نتائج سريعة بحيث يتم مشاهدة البكتيريا ان وجدت تحت المجهر وعلى القوة الكبرى (X40) في العينة بمظهر متألق واضح . وفي حالة ظهور البكتيريا بهذه الصبغة يمكن صبغ نفس المسحة بصبغة غرام من أجل تمييز أنواع البكتيريا الموجودة والتعرف عليها .

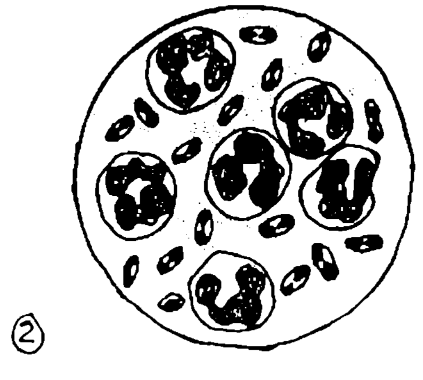
3-التحضير الرطب Wet mount :.

يتم عمل التحضر الرطب للراسب Sediment بالمحلول الملحي Normal sline للكشف عن العديد من مسببات التهاب السحايا مثل طفيلي E. histolytica ويمكن عمل التحضير الرطب بالحبر الهندي India-Ink عند الشك بوجود فطر Cryptococcus بحيث تظهر خلايا الفطر شفافة متبرعمة على خلفية معتمة .

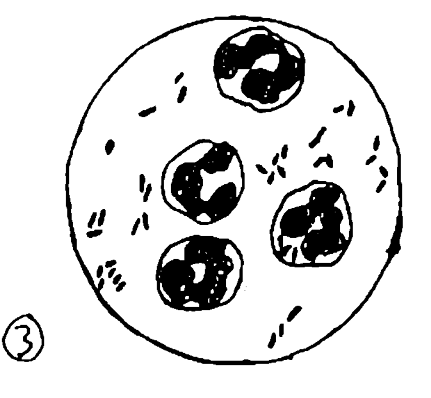
1- بكتيريا N. meningitidis خلايا سالبة لصبغة غرام، كروية مزدوجة توجد داخل وخارج كريات الدم البيضاء.



2- بكتيريا S. Pneumonia خلايا كروية مزدوجة، موجبة لصبغة غرام، ملتقية النهايات ومحاطة بمحفظة.



3- بكتيريا H. influenzae خلايا عصوية قصيرة سالبة لصبغة غرام توجد في الغالب خارج كريات الدم البيضاء.



أهم مسببات التهاب السحايا كما تظهر في مسحة مصبوغة لعينة CSF

ثالثاً: الفحوصات الكيميائية والمصلية Serelogicl and Chemical test :

1- الفحوصات الكيميائية :

تتغير نتيجة لالتهاب السحايا قيم المكونات الكيميائية لسائل CSF إذ انه من المفيد التعرف على بعض القيم الكيميائية في CSF ومقارنتها مع القيم الطبيعية ونسب هذه المواد في الدم من أجل المساعدة في تشخيص نوع الإصابة. ومن الفحوصات الكيميائية التي يمكن إجراؤها على عينة CSF ايجاد نسبة السكر و البروتين وحامض اللاكتيك Lactic acid والغلوتامين glutamine ويبين الجدول التالي مقارنة لأهم نسب مكونات CSF الخلوية والكيميائية بين الحالة الطبيعية وحالة التهاب السحايا اعتماداً على نوع المسبب.

نوع المسبب	عدد كريات الدم البيضاء لكل ملم مكعب leukocytes	نوع كريات الدم الأكثر وجوداً (السائدة)	تركيز السكر mg/dl Glucose	تركيز البروتين mg/dl protein	نتيجة الزراعة على الأوساط البروتينية
الحالة الطبيعية	صفر-6	لمفية lymphocyte	85-45	45-15	سلبية
البكتريا	20000-6	متعادلة Neutrophils	اقل من 45 (20-5)	أكثر من 50	ايجابية
الفيروسات	1000-100	لمفية Lymphocyte	طبيعي	طبيعي أو مرتفع قليلاً	سلبية
M.Tuberculosis	500-25	لمفية Lymphocyte	اقل من 45 (40-20)	أكثر من 50	سلبية
الفطريات	صفر-1000	لمفية Lymphocyte	اقل من 45	أكثر من 50	سلبية

2- الفحوصات المصلية :

تستخدم الفحوصات المصلية لتشخيص وتحديد مسبب التهاب السحايا الجرثومي بشكل سريع وعلى العينة مباشرة وهي كما يلي :.

أ-الكشف عن انتجينات البكتريا مباشرة في العينة Diret Detection of Bacterial Antigens :

ويتـم ذلـك عـن طريـق فحـص التخـثر Latex agglutination باسـتخدام طقم (Kit) مكون من أجسام مضادة محضـرة ومتخصصـة للكشـف عـن انتجينـات المحفظة Capsular antigens للأنواع الشائعة من البكتيريا المسببة لالتهاب السحايا وهي.H S.pneumonia N.meningitidis streptococcus Group B E.coli influenzae typeb و يتكون الطقم kit من خمس عبوات كل عبوة تحتوي على اجسام مضادة ملتصقة بجزيئات latex خاصة بنوع واحد من البكتيريا إذ يتم خلط نقطة واحـدة مـن أيـة عبـوة مـع نقطـة مـن CSF بحيـث تكـون النتيجـة الايجابيـة علـى شـكل تخثر Agglutination وهذا دليل على وجود النوع البكتيري الذي يتم البحث عنه .

ب-فحص الإنتفاخ Quallung test :

الذي يستخدم للكشف عن وجود بكتيريا S.pneumonia في العينة مباشرة.

ج-فحص VDRL :

يستخدم للكشف عن الأجسام المضادة التي كونـها الجسـم نتيجـة للاصابـة ببكتيريا T.pallidum كذلك يمكـن الكشـف عـن أي نـوع مـن الأجسـام المضـادة بشكل غير مباشر في الدم والناتجـة مـن الاصابـة بـأي نـوع مـن الجراثيـم بـالطرق المصلية المتعددة .

د-استخدام تقنية الحقل المظلم Dark field techneque

للكشف عن اللولبيات Spirochetes

ويتم اجراء فحص التخثر Latex agglutination للكشـف ايضـا عـن فطـر cryptococcus في العينة مباشرة .

هـ- يمكن الكشف عن انتيجنات أي نوع من مسـببات التـهاب السـحايا في عينـة CSF بواسطة مجموعة من الفحوصات المصلية مثل

1- الفحوصات التألقية Fluorescent Ab. techniqes

2- الترحيل الكهربائي Immunoelectrophoresis

رابعاً: الزراعة Culturing :

يتم زراعة عينة CSF على أوساط متعددة لتوفير متطلبات النمو لأكبر عـدد مـن البكتيريا التي قـد توجـد في العينـة ويؤخـذ الانبـوب الثـاني أو الثـالث المحتـوي علـى سائل CSF كما أسلفنا في ظروف معقمة ويجرى له عملية الطـرد المركـزي ثـم يفصـل الجزء الطافي ويحرك الراسب جيداً ويحقن عدة نقاط من الراسـب في عـدة أوسـاط كمـا يلي:

1- **روتينياً** تحقن العينة في وسطين معاً هما وسط آجار الدم Sheep Blood agar و وسط chocolate agar ثم تحضن الأطباق هوائياً مع توفير 5-10% CO_2 في درجة حرارة 37مْ ويمكن وضع الأطباق في Candle Jar لتوفـير كميـة مناسـبة مـن CO_2 وينصح بزراعة العينة لا هوائياً في حل كون سـائل CSF يحتـوي عـدداً قليـلاً مـن كريات الدم البيضاء . ثم يتم مراقبة النمو كـل 24 سـاعة لمـدة 5-7 أيـام و7-10 أيام للأطباق التي تحضن لا هوائياً قبل اعطاء النتيجة السلبية للنمو No Growth .

2- **يزرع** جزء من العينـة لا هوائيـاً في Candle Jar في أوسـاط سـائلة غنيـة مثـل Thioglycollate broth أو Cooked meat broth مـع عـدم اغـلاق اغطيـة الأنابيب بأحكام للسماح بتبادل الهواء مع البيئة المحيطة .

3- **إذا تم مشاهدة** عصيات سالبة لصبغة غرام G-ve bacilli في صبغة غـرام ينصـح بزراعة جزء من العينة على وسط MacConkey agar.

4- في التـهاب السـحايا المزمـن **وعنـد الشـك بوجـود بكتيريـا السـل M. tuberculosis** ينصح بأخذ اربع عينات من المريض في أربعة ايـام متتاليـة ثـم أخذ الراسب من العينة وحقنة في وسـط L.J.media وحضنـة علـى درجـة 37 درجة مئوية بوجود CO_2 لمدة 8 أسابيع .

5- **للكشف عن الفطريات** يحقن جزء من الراسب في أوساط مثل وسـط SDA و وسط Brain heart infusion مضافاً إليها بعض المضادات الحيوية .

6- يتم زراعة العينات المحتوية على الفيروسات في المزارع النسيجية Tissue culture.

7- يتم عمل فحص التحسس الجرثومي للمضادات الحيويـة Sensetive test لأي نمو يظهر على الأطباق بعد فترة الحضانة .

الباب السابع

زراعة الدم Blood culture

مقدمة :

يعتبر الدم في الوضع الطبيعي سائلاً جسمياً معقماً إلا أن أعداداً من البكتيريا الحية قد تظهر فيه في بعض الحالات وهذا ما يسمي بتجرثم الدم Bacteremia وقد تدخل أعداد قليلة من البكتيريا أحياناًالى الدم و التي تكون موجودة كساكن طبيعي في الجهاز التنفسي أو الهضمي ليتم القضاء على هذا العدد القليل بواسطة الخلايا الملتهمة Macrophages والكبد Liver والطحال Spleen أما إذا كان عدد البكتيريا الداخلة إلى الدم كبيراً فإن مناعة الجسم لا تتمكن من إزالة هذا العدد من البكتيريا فيحدث تجرثم الدم Bacteremia ويمكن أن يكون تجرثم الدم على ثلاثة وجوه هي :.

أ- تجرثم الدم العابر Transient Bacteremia :

يحدث هذا النوع نتيجة لمرور الجراثيم عبر الدم لفترة زمنية قصيرة ويكون مصدر هذه الجراثيم من خارج الأوعية الدموية Extravascular source إذ أن بعض أنواع الساكن الطبيعي الموجودة على الأغشية المخاطية للجسم تستطيع دخول مجرى الدم نتيجة لتحطيم الشعيرات الدموية القريبة منها فمثلاً تؤدي أدوات إصلاح الأسنان أو قرحة الأمعاء إلى دخول الساكن الطبيعي الموجود في هذه المناطق إلى الدم ويكون هذا النوع من تجرثم الدم في الغالب بدون أعراض .

ب- تجرثم الدم المتردد Intermittent Bacteremia :

يكون مصدر هذا النوع من خارج الأوعية الدموية وخاصة من العقد اللمفية إذ يتم إفراز الجراثيم إلى مجرى الدم نتيجة لتجمع عدد كبير منها في العقد اللمفية وتكون هذه الحالة غالباً متصاحبه مع أعراض تبدأ بالقشعريرة المفاجئة وارتفاع درجة

الحرارة وتعتبر التهابات المسالك البولية والجهاز التنفسي السفلي (Pneumonia) والتهابات الجروح من أهم مصادر هذا النوع من تجرثم الدم.

ج- تجرثم الدم المستمر Continous bacteremia،

تعتبر الالتهابات داخل الأوعية Intravascular infection هي المصدر الرئيسي لهذا النوع من تجرثم الدم إذ أن هذه الالتهابات تزود الدم بالجراثيم باستمرار ومن الأمثلة المهمة على التهابات داخل الأوعية التهاب غشاء القلب الداخلي(شغاف القلب) Endocarditis والتهابات صمامات القلب والتي قد تنتج من البكتيريا التالية :

Enterococcus spp   Viridans streptococci

S.aureus   Strep.group D

S.epidermidis

أيضاً ومن الأمثلة المهمة على هذا النوع من تجرثم الدم هو الالتهاب المترافق مع انبوب القسطرة Catheter-associated infection وهو عبارة أنبوب مطاطي يتم ادخالة في اوردة بعض المرضى من اجل اعطاء الدواء او الدم لهم إذ قد يسبب هذا النبوب دخول الجراثيم الموجودة على الجلد معه لتؤدي الى تجرثم الدم وأهم هذه الجراثيم هي:

Klebsiella spp Bacillus spp Corynebacterium jeikeium Enterobacter spp	S. epidermidis S. aureas Dephtheroids

ومن الجدير بالذكر أن معظم حالات تجرثم الدم تكون متبوعة بحالة تسمم الدم Septicemia ويعني هذا المصطلح وجود سموم Toxin أو مركبات البكتيريا في الدم الذي يترافق مع قشعريرة مفاجئة وارتفاع في حرارة الجسم وزيادة في نبضات القلب وقد يؤدي إلى صدمة Septic shock وموت للمريض ، وبسبب ظهور تسمم الدم الذي قد يؤدي إلى الوفاة يلجأ الطبيب إلى زراعة الدم لعزل المسبب من

أجل إعطاء المضادات الحيوية مباشرة للمريض كذلك يلجأ الأطباء إلى زراعة الدم للمواليد الجدد Newborn عند الشك بتجرثم الدم لديهم مع أن المواليد الجدد تختفي لديهم الأعراض المثالية لتجرثم الدم فتكون عملية زراعة الدم وإعطاء المضاد الحيوي عبارة عن عملية وقاية وعلاج في آن واحد . ولقد وجد أن البكتيريا المسببة لتجرثم وتسمم الدم تدخل إلى الدم من المناطق الجسمية التالية وبالنسب المبينة أدناه .:

25% من القناة البولية التناسلية .

20% من القناة التنفسية .

10 %من التقيحات Abscesses .

5% من التهابات الجروح الناتجة بعد العمليات الجراحية .

5% من القناة الصفراوية .

35%من مواقع وأسباب أخرى .

و يطلق مصطلح Fungemia على حالة وجود الفطريات في الدم والتي غالباً ما تظهر عند الأشخاص ذوي المناعة المتدنية ويعتبر فطر C.albicans اكثر أنواع الفطريات شيوعاً في هذه الحالة . وتعتبر الأنواع البكتيرية التالية هي الأكثر شيوعاً في حالات تسبب تجرثم الدم والتي عزلت بواسطة مزارع الدم:

أ- مسببات تجرثم الدم عند البالغين Adult bacteremia	
Pseudomonas	S. pneumonia
N.meningitidis	E. coli
H.influnzae	Klebsilla
C.perfringens	Enterobacter
Bacteroides	Proteus
	Serratia

ب- مسببات تجرثم الدم لدي المواليد الجدد :

E.coli , Group B streptococcus , L.monocytogenes

ج-مسببات التهاب غشاء القلب الداخلي (شغاف القلب)Endocarditis :

Viridans streptococci

Group D streptococcus

S. epidermidis

Pseudomonas aeruginosa

S.aureus

د-مسببات تجرثم الدم المترافق من أنابيب القسطرة **Catheter – associated infections**	
S epidermidis S.aureus .Diphtheroids	Corynebacterium Jeikeium Klebsiella Enterobacter Bacillus spp

هـ-المسببات الأخرى لتجرثم الدم	
Beta-henolytic streptococci	Xanthomonas
Salmonella	Leptospira
Anaerobes	Candida spp
Campylobacter	H.capsulatum
Mycoplasma	Nocardia
Brucella	Cryptococcus
Actinobacter	

وقد ذكر كتاب Microbiology and infections disease لمؤلفة(Gabriel Virella) الطبعة الثالثة أن نسب تكرر مجموعات البكتيريا المعزولة في مزارع الـدم كما يلي :.

1- البكتيريا الكروية الموجبة لصبغة غرام حوالي 31-41 %

2- البكتيريا العصوية الموجبة لصبغة غرام حوالي 1%

3- البكتيريا العصوية السالبة لصبغة غرام حوالي 47 -61 %

4- الأنواع اللاهوائية حوالي 2-17%

5- الفطريات 2-12 % من مجمل الحالات .

جمع عينة الدم Collection of Blood speciman :

تعتبر زراعة الدم هي الطريقة الوحيدة والمهمة لتشخيص الإصابات البكتيرية الجهازية Systemic infection إذ تستخدم عينة الدمBlood من اجل تحديد مسببات تجرثم الدم Bacteremia حيث أن هذه المسببات لا توجد بصورة دائمة في الدم وإنما توجد في أوقات معينة وتكون عادة قليلة العدد ونادرة الوجود ولأجل الحصول على نتائج دقيقة وصحيحة ولنجاح عملية زراعة الدم يجب مراعاة الأمور التالية خلال عملية جمع عينة الدم :.

1- مراعاة ظروف التعقيم الجيد من كل مراحل العمل .

تعتبر عملية تلوث العينة بالساكن الطبيعي الموجود على الجلد Skin Normal Flora من أهم المشاكل التي تواجه عملية زراعة الدم إذ تؤدي إلى الحصول على نتائج إيجابية خاطئة وذلك لأن التهاب شغاف القلب Endocarditis والالتهابات المترافقة مع أنبوب القسطرة Catheter associated infection تنتج من نفس الأنواع البكتيرية الموجودة على الجلد لذا يتوجب على الفني مراعاة كافة ظروف التعقيم اللازمة لتلافي هذا الالتباس في نتائج الزراعة والتي تتضمن ما يلي:

أ - استخدام أوعية وأدوات جمع معقمة ومراعاة التعقيم الشديد في كافة خطوات العمل مثل استخدام إبر وسرنجات Syrings معقمة كذلك تعقيم فوهة عبوة الوسط الزراعي قبل عملية الزراعة وإجراء عملية الزراعة في ظروف معقمة .

ب- تحديد الوريد المراد سحب الدم منه وتعقيم الجلد بشكل جيد يضمن القضاء على الساكن الطبيعي الموجود في مكان السحب بشكل جيد ويتم ذلك بالطريقة التالية :

* ارتداء القفازات gloves المعقمة .

* مسح منطقة سحب الدم بشكل جيد بالكحول 70% .

* مسح منطقة سحب الدم باليود Iodine 2% وتركة لمدة دقيقة واحدة ويمكن استخدام مركب Chlorhexidine gluconate لتعقيم أيدي الأشخاص الذين لديهم تحسس لمادة اليود .

* إزالة اليود المتبقي بقطنه تحتوي على الكحول .

سحب الدم تحت ظروف معقمة ثم نقل الدم إلى عبوة الزراعة Blood culture مباشرة وبأسرع وقت ممكن مع مراعاة عدم لمس منطقة سحب الدم باليد قبل عملية السحب .

2- **يفضل أخذ العينة قبل تناول المضادات الحيوية أما في الحالات الطارئة والملحة** فيتم إضافة مواد كيميائية محطمة للمضادات الحيوية إلى العينة مثل Penicillinase المحطم للبنسلين .بالإضافة إلى ذلك فان بعض مكونات المزارع البكتيرية قد تؤدي إلى معادلة بعض أنواع المضادات الحيوية إن وجدت مع الدم.

3- **وقت أخذ العينة Time of Blood Collection :**

ان وقت اخذ عينة الدم ليس من الأمور المهمة جداً في عملية الزراعة إلا انه يوصي بمراعاة الوقت في الحالات التالية :

أ-يفضل سحب العينة قبل تناول المضادات الحيوية كما أسلفنا .

ب-يفضل سحب العينة أثناء أو بعد نوبات القشعريرة و الحمى .

ج-يفضل أيضاً سحب العينة اعتماداً على أطوار المرضى Stage of disease إذ تكثر البكتيريا في الدم أثناء الطور الحاد للمرضى Chronic stage لذا يفضل أخذ عينة الدم في الأيام الأولى للإصابة ببعض الأمراض مثل التيفوئيد Typhoid لأنه وبعد مرور وقت من الإصابة فإن عدد البكتيريا في الدم يقل وتعمل الأجسام المضادة المتكونة في دم المريض على منع وتثبيط نمو البكتيريا في المزارع البكتيرية .

د- بسبب اختلاف عدد البكتيريا من وقت إلى أخر في نفس الشخص يفضل اخذ عدة عينات للزراعة بين كل عينة وأخرى 1-3 ساعات أو علـى عـدة أيام متتالية كما في حالة الإصابة بالحمى المالطية والتهاب (شغاف القلـب) . Endocarditis

هـ- أما في الأشخاص المتعاطين للمضادات الحيويـة فيفضـل أخـذ عينتـين في نفس الوقت ومن مكانين مختلفين من الجسم .

4-حجم عينة الدم المطلوبة Volum of specimen :

يعتبر حجم عينة الدم المأخوذ من المريض من العوامل المهمة في نجـاح عمليـة الزراعة إذ انه كلما كانت كمية الدم أكبر وضمن الحد المطلوب زاد ذلك من فرصـة العثور على الكائن المسبب لتجرثم الدم . وقد أشارت جميع المراجع الخاصة بذلـك أن عينة الدم المأخوذة للزراعة من الأشخاص البالغين يجب أن تكون ما بين 10-20 ملليتر وتسحب بأبرة وحقنة معقمتين حيث أن حجم الدم للزراعة يجب أن لا يقـل عن 10 ملليتر بينما افضل حجم من الدم للزراعة يؤخذ من الأطفال حديثي الولادة من 1-2 ملليتر ومن الأطفال الذين تتراوح أعمـارهم بـين شـهر -6 سـنوات هـي 2،4-5ملليتر من الدم لكل عبوة زراعة .أما في حال عـدم التمكـن مـن عمـل عـدة زراعات للدم لأسباب مثل الحاجة الماسة للمعالجة ولاختصار الوقت يفضـل سـحب 40 ملليتر من الدم في وقت واحد تسحب كل 20 ملليتر منـها مـن مكـان منفصـل من الجسم بإبرة وحقنة منفصلة ثم تزرع وتعامل كل 20 ملليتر كعينة منفصلة .

5- عدد عينات الدم اللازمة للزراعة Number of blood culture :

يساعد عدد عينات الدم المأخوذة للزراعة في زيادة فرصة العثور علـى الكـائن المسبب لتجرثم الدم حيث أشارت الدراسات العلمية في هـذا المجـال أن اخـذ عينـة واحدة من الدم قادر على الكشف عن 80% من حالات تجرثـم الـدم بينمـا يكـون اخذ ثلاث عينات من الدم خلال 24 سـاعة قـادراً علـى الكشـف عـن 99% مـن حالات تجرثم الدم بشرط أن تكون العينات من أماكن مختلفة مـن الجسـم وبأوقـات متباعدة وتزرع كل عينة في عبوتين أحدهمـا تحضـن في ظـروف هوائيـة وأخـرى في

ظروف لا هوائية وقد أشارت بعض المراجع أن الأطفال الصغار يكفي أخذ عينة واحدة فقط من الدم للكشف عن تجرثم الدم لديهم لان عدد الجراثيم في دم الأطفال الصغار يكون مرتفعاً أكبر من البالغين وذلك بسبب صغر حجم الجسم وقلة المقاومة لديهم .

وينصح بأخذ 3 عينات تزرع في 6 عبوات لتشخيص التهاب الغشاء الداخلي للقلب Endo carditis وذلك بسبب انخفاض الجراثيم الموجودة في الدم في هذه الحالة ولان مسببات هذا الالتهاب هي من الجراثيم الموجودة كساكن طبيعي على جلد الإنسان والشائعة كملوثات لمزارع الدم حيث يمكن من خلال تعدد العينات التمييز بين الإصابة الحقيقية وبين تلوث العينة بهذه الجراثيم .أما في حالة عدم التمكن من أخذ عدة عينات دم للزراعة ينصح بأخذ 40 ملليتر من الدم كل 20 ملليتر تؤخذ من مكان منفصل وبأدوات سحب منفصلة وتزرع أيضاً في عبوة منفصلة عن الأخرى كما بينا سابقاً .

يفضل زراعة عينة الدم بعد أخذها من المريض في العبوة المخصصة للزراعة مباشرة مع مراعاة ظروف التعقيم جيداً . ومن ثم نقل العينة إلى المختبر ووضعها في الحاضنة بسرعة ويجب عدم حفظ عبوة الزراعة المحتوية على الدم في الثلاجة بل وضعها في الحاضنة مباشرة .

مزارع الدم Blood Culture :

تتميز عبوات مزارع الدم بمكونات شاملة تمكنها من أداء وظيفتها بنجاح إذ تضمن المواد المكونة لهذه المزارع الاحتياجات الغذائية العامة لنمو معظم الأحياء الدقيقة المتوقع وجودها في الدم كذلك تضمن تثبيط وسائل مناعة الجسم التي توجد في عينة الدم وبذلك فهي تضمن ظروفاً مناسبة للحصول على نتائج زراعة جيدة .

مكونات عبوة زراعة الدم :.

1) 50 –100 ملليتر من الوسط السائل Nutrient broth و المكون من عدة أوساط مثل :

Trypticase soy broth

Brain heart infusion broth

Thioglycolate broth

Pepton water

broth Brucella

وفي بعض الحالات يتم إضافة المواد التالية إلى مزارع الدم وهي :.

أ- 10 ٪سكروزSucrose من اجل تنشيط نمو أنواع معينة من البكتيريا مثل بعض العصيات السالبة لصبغة غرام .

ب- Penicillinase من اجل تحطيم البنسلين عند الأشخاص المتعاطين لهذه المضاد الحيوي والسماح بحرية النمو للبكتيريا .

ج- مواد تعمل على معادلة وإزالة الأجسام المضادة Antibody في الدم وتسمى Resins . ومن الجدير بالذكر انه يجب أن لا يكون وسط زراعة الدم اختيارياً Selective وذلك من اجل السماح بنمو كل أنواع البكتيريا المتوقع وجودها في الدم بشكل طبيعي ومتوازن .

2) كذلك تحتوي عبوة زراعة الدم على مادة مانعة للتجلطAnticoagulant من أجل منع تجلط عينة الدم التي بدورها قد تمنع نمو الجراثيم على المزرعة .

ومن موانع التجلط التي تستخدم في مزارع الدم هي EDTA و Citrate و Oxalate وHeparin حيث وجد إن كل السابقة ذات تأثير سام على بعض أنواع البكتيريا .وقد وجد إن انسب مانع تجلط يفضل استخدامه في مزارع الدم هو Sodium Polyanethol Snlfonate (SPS) الذي يسمي Liquoid بتركيز (0.05٪) وذلك لأنه :.

أ-يثبط عمل النظام المضاد للجراثيم في دم الإنسان والمتمثل بعملية البلعمة Phagocytosis والأجسام المضادة Antibodies ونظام المتمم Complements .

ب- ثابت في درجة الحرارة Autoclave .

ج-يعمل على تثبيط عمل بعض المضادات الحيوية مثل وGentamyein و Streptomycin ،Polymyxin B

مع وجود بعض المساؤى لهذا المركب مثل تثبيط نمو بعض المكورات الموجبة لصبغة غرام Gram positive cocci و بكتيريا Neisseria وبكتيريا Gardnerella vaginalis حيث ينصح بإضافة 1-2 من مادة الجلاتين gelatin لمعادلة التأثير السلبي لمادة SPS .

تخفيف الدم (حجم الدم بالنسبة للسائل في المزرعة)

Dilution of Blood (Volume of blood to broth)

تحتوي عينة الدم المأخوذة للزراعة على عوامل قاتلة للجراثيم مثل الأجسام المضادة والخلايا الملتهمة Phagocytes وبروتينات المتمم Complements بالإضافة إلى احتمالية وجود أدوية ومضادات حيوية وهذا قد يؤدي إلى قتل وتحليل الجراثيم المسببة لتجرثم الدم فيها لذلك يتم اللجوء إلى تخفيف العينة بنسبة كافية لمعادلة تأثير العوامل القاتلة للجراثيم وفي الجهة المقابلة إعطاء فرصة مناسبة لنمو الجراثيم. وقد وجد إن أقل تخفيف يجب استخدامه في مزارع الدم هو بنسبة (10:1) حجم واحد من الدم إلى عشرة أحجام من الوسط السائل Broth .

ملاحظة:

يفضل حقن عينة الدم في عبوة الزراعة مباشرة وإذا تطلب الأمر يمكن حفظ عينة الدم مخلوطة مع مادة مانعة للتخثر في الثلاجة لوقت لا يتجاوز الساعتين .

يفضل ترك عبوة زراعة الدم تأخذ درجة حرارة الغرفة قبل حقن عينة الدم فيها إذا كانت محفوظة في الثلاجة أصلاً .

الزراعة ومراقبة النمو Culturing and examination of growth :

كما أسلفنا تزرع عينة الدم مباشرة في عبوة خاصة تحتوي وسط زراعة الدم ويفضل حقن كل (10 مل) من الدم في عبوة زراعة خاصة بحيث يتم زراعة عبوتين تحضن إحداهما في ظروف هوائية والأخرى في ظروف لا هوائية على درجة حرارة

37 درجة مئوية .وبما أن عبوة زراعة الدم محضرة بطريقة توفر في داخلها جواً يحوي على نسبة من ثاني أكسيد الكربون الذي يناسب نمو معظم أنواع البكتيريا ولكن هذا الجو لا يساعد في نمو الأحياء الهوائية الإجبارية مثل Pseudomonas وyeast و Acinetobacter لذا يفضل السماح لكمية من الهواء بالدخول إلى عبوة الزراعة وذلك بإدخال إبرة معقمة عبر غطاء العبوة تكون الإبرة مغطاة بالقطن من الأعلى وهذا يساعد في دخول الهواء الذي يناسب نمو الأنواع السابقة . ويراقب النمو في مزرعة الدم Blood culture خلال الأسبوع الأول من الحضانة يومياً لأن معظم أنواع البكتيريا المسببة لتجرثم الدم تنمو خلال 6-18 ساعة من زراعتها إن وجدت وتتم عملية المراقبة كما يلي :.

أ- **بعد 6-18 ساعة من الحضانة** : يتم مراقبة علامات ودلائل نمو الأحياء الدقيقة في المزرعة بالعين المجردة إذ يكون النمو على شكل تغيرات في طبيعة الوسط وهذه التغيرات قد تظهر بشكل عكورة أو تحلل لكريات الدم الحمراء أو ظهور فقاعات من الغاز أو مستعمرات صغيرة منتشرة في الوسط السائل أو قد يشكل النمو طبقة تترسب على سطح كريات الدم الحمراء وقد تظهر مستعمرات بكتيرية واضحة على السطح الأجار الصلب في المزارع ثنائية الوجه Diphasic media (أي التى تحتوي على وسط سائل broth ووسط صلبNutrient agar معاً) وفي حال ظهور النمو يجب عمل صبغة غرام لمسحةsmear من الوسط بعد تحريكه جيداً وكذلك عمل زراعةsubculture على وسط صلب لتأكيد وجود النمو الجرثومي الاإن ظهور العكورة في الوسط ليس دليلاً أكيداً على وجود النمو الجرثومي فيه وذلك لأن تحلل كريات الدم الحمراء وتكون خيوط الفايبرين Fibrin نتيجة لطول فترة الحضانة يؤدي إلى ظهورعكورة في الوسط السائل وهذا مايتم تمييزه بواسطة صبغة غرام .

ب- **خلال 12-24 ساعة وفي حل عدم ظهور أي دلائل أو إشارات للنمو الجرثومي في المزرعة** : يتم عمل زراعة عشوائياً Blind subculture على وسط Chocolate agar الذي يوضع في الحاضنة لمدة 48 ساعة بوجود 5-10٪CO_2 على درجة

حرارة 37 درجة مئوية ثم يتم مراقبة ظهور النمو . وتعتبر هذه الزراعة العشـوائية Blind subculture مفيـدة لأن بعـض أنـواع البكتيريـا مثـل Neisseria و H.influenzae و S.pneumonia لا يؤدي نموها إلى ظهور العكورة في الوسط كما وتنتج الأخيرة أيضاً أنزيمات محللة تؤدي إلى تحلل خلاياها مع طول فـترة الحضانـة لذا تكون الزراعة العشوائية مفيدة في تشخيص وجود الأنواع البكتيرية السابقة. بينما لا تعتبر الزراعـة اللاهوائيـة العشـوائية Blind anaerobic sub culture ضرورية لان نمو البكتيريا اللاهوائية غالباً يؤدي إلى ظهور العكـورة في الوسـط . وفي حال عدم ظهور النمو هنا أيضاً يجب إعطاء الطبيب تقريراً مبدئياً عـن عـدم وجود النمو البكتيري حتى ذلك الوقت .

ج- وبعد ذلك **وخلال 2-7 أيام** يتم مراقبة ظهور دلائل النمو في الوسط يومياً ثـم يعطى تقريرنهائي اذا لم يظهر النمو بعد اسبوع من الحضانة .

د- **وفي حال بقاء نتيجة الزراعة سـلبية لعـدم ظـهور النمـو** في مزرعـة الـدم تـترك الأوساط في الحاضنة لمدة أسبوعين آخرين ويراقب النمو بأوقـات متباعدة حيـث إن بعض أنواع البكتيريا المسببة لالتهاب شغاف القلب أو الحمي المالطية وخاصة الأنواعBrucella وYeast و Franciselleتحتاج لفترة حضانة تقـارب الشـهر بسبب نموها البطيء.ويتم إعطاء نتيجة زراعة سلبية No Growth والتخلص مـن مزارع الدم بعد ثلاثة أسابيع من الحضانة في حـال استمرار عـدم ظـهور النمـو الجرثومي في المزرعة .

خطوات التعامل مع مزارع الدم الإيجابية (ظهور النمو)

Handling of positive blood culture:

إن ظهور النمو في مزرعة الدم يتطلب اتباع مجموعة من الخطوات مـن اجـل الوصول إلى تشخيص صحيح للكائن المسبب لتجرثم الدم وهي كما يلي :.

عند مشاهدة النمو في مزرعة الدم بالعين المجردة يتم إجراء ما يلي :.

1- أخذ قطرة من مزرعة الدم وعمل مسحةsmear وصبغـها بصبغـة غـرامGram stain لمعرفة شكل وترتيب الكائن الموجود في العينة وتفاعله مع الصبغة ثم

إخبار الطبيب بالنتيجة مبدئياً.

2- نقل عينة أخرى من مزرعة الدمBlood culture بطريقة معقمة وزراعتها (sub culture) على عدة أوساط اعتماداً على نتيجة الصبغة ومن الأوساط المستخدمة هنا وسطChocolate agar و وسطBlood agar ويمكن استخدام وسط MacConkey agar عند مشاهدة البكتيريا السالبة لصبغة غرام في المسحة المصبوغة ثم يفضل حضن وسط Blood agar لا هوائياً وحضن وسط Chocolate agar هوائياً بوجود نسبة من CO2 .

3- إجراء فحص التحسس للمضادات الحيوية Susceptibility test على عينة من مزرعة الدم مباشرة بطريقة قرص الانتشا Disk diffusion.

4-قراءة نتائج الزراعة وفحص التحسس بعد فترة الحضانة وتزويد الطبيب بالنتيجة مباشرة.

ب-أما عند عدم مشاهدة النمو في المزرعة بالعين المجردة وظهور النمو في المزرعة العشوائيةBlind sub culture فيجب إعداد مسحة مصبوغة بصبغة غرام وعمل فحص الحساسية للمضادات الحيوية والفحوصات التشخيصية الأخرى للمستعمرات النامية في المزرعة العشوائيةBind sub culture ثم تزويد الطبيب بالنتيجة مباشرة .

تقييم النتيجة الإيجابية لمزرعة الدم :

إن اكبر المشاكل التى تواجه زراعة الدم هي مشكلة التلوث حيث أن 30% من مزارع الدم الإيجابية تُظهر تلوثاً بالساكن الطبيعي الموجود على جلد الإنسان وذلك بسبب التساهل في عملية تعقيم الجلد قبل سحب العينة .وتحتوي معظم مزارع الدم الإيجابية على كائن واحد مسبب لتجرثم الدم بينما يظهر في حوالي 2-30% من مزارع الدم الايجابية عدة أنواع من البكتيريا مجتمعة أو الفطريات كمسبب لتجرثم الدم . وتساعد النقاط التالية على تحديد صحة ودقة زراعة الدم الإيجابية وتمييز النتيجة الإيجابية الصحيحةTrue positive عن التلوث الجرثومي للعينة السليمة Contamination :

أ- نمو نفس الجرثومة في عدة مزارع أخذت في أوقات مختلفة ومن عدة مناطق من الجسم دليل على وجود تجرثم الدم .

ب- نمو نوع واحد في أحد المزارع وعدم نموه في غيرها دليل على التلوث ويفضل إعادة الزراعة مرة أخرى مع مراعاة ظروف التعقيم بشكل جيد .

ج - نمو أنواع جرثومية مختلفة في مزارع دم متعددة دليل على التلوث Contamination إذ يفضل إعادة الزراعة مرة أخرى .

د- نمو الساكن الطبيعي للجلد Skin Normal Flora مثل diphtheroids Staphylococcus epidermidis ، anaerobic gram positive cocci

في مزرعة دم واحدة دليل على التلوث بينما نمو النفس الأنواع السابقة في عدة مزارع لنفس الشخص دليل على وجود تجرثم الدم .

ملاحظة : يكتب تقرير المختبر اعتماداً على النتائج التي يتم الحصول عليها خلال فترة الحضانة أو بعدها وهي في العادة تكون كما يلي :

1- عند مشاهدة مظاهر النمو البكتيري في المزرعة يتم تأكيد ذلك بإجراء صبغة غرام وعندما تكون نتائج الصبغة إيجابية يتم أخبار الطبيب المعالج بالهاتف مبدئيا بظهور النمو وبعد ذلك يكتب تقرير زراعة الدم النهائي Final blood culture report الذي يكون محتويا على أسم الكائن المسبب لتجرثم الدم ونتيجة فحص التحسس للمضادات الحيوية Susceptibility test .

2- يتم كتابة تقرير مبدئي خلال 1-7 أيام من الحضانة وخاصة عند عدم ظهور النمو ويصاغ كما يلي مثلا:

(Blood culture show no growth after 3 day final report to follow)

3* أما التقرير النهائي عند عدم ظهور النمو في المزرعة يكون بعد سبعة أيام من الحضانة في العادة كما يلي :

(Final report : Negative after 7 days incubation)

باستثناء بعض المسببات التي تحتاج إلى فترات حضانة أطول من أسبوع بسبب نموها البطيء كما أسلفنا .

الأنظمة الآلية لمزارع الدم Automated blood culture systems :

يعتبر حاليا ظهور العديد من الأنظمة الآليةAutomated للكشف عن ظهور النمو في مزارع الدم إذ تتم عملية الحضانة ومتابعة النمو وأعطاء النتيجة آليا وتتميز الطرق الآلية بشكل عام عن الطرق اليدوية بما يلي :

1- توفير الوقت إذ يتم الحصول على نتيجة الزراعة الإيجابية بوقت اقل وسرعة اكثر من الطرق اليدوية

2- اكثر دقة وحساسية من الطرق اليدوية : ويقوم النظام الآلي ذاتيا بالكشف عن النمو البكتيري في مزارع الدم من خلال قياس نسبة ثاني أوكسيد الكربون الناتجة من تحلل الكربوهيدرات في المزرعة كأحد نواتج الايض ويعتبر النوعين التاليين هما الأكثر شيوعا في أجهزة الكشف الآلي عن النمو في مزارع الدم :

1-نظام Bactec:

وهو نظام يعتمد على اخذ كمية من اهواء الموجود في مزرعة الدم ثم قياس نسبة CO_2 وهي في العادة كما يلي :

الطريقة الاولى : تعتمد على قياس نسبة CO_2 في المزرعة بالطريقة الإشعاعية Radio metric إذ تستخدم مركبات تحتوي على كربون مشع مثلC^{14}-glucase تعمل البكتيريا على تحليلها وإنتاج مركبCO_2 المحتوي على ذرة الكربون المشعة فتستخدم الطريقة الإشعاعية لقياس نسبة الكربون المشع وبالتالي يتم قياس نسبة ثاني أوكسيد الكربون الموجود في العينة

الطريقة الثانية : فتعتمد على القياس الكمي لغازCO_2 في المزرعة بواسطة جهاز الطيف الضوئي المزود بالأشعة تحت الحمراء Infrared spectrophotometer .

2- نظام Bac-T/Alert :

الذي يعتمد على قياس تغيير لون المزرعة والناتج عن زيادة نسبة غاز ثاني

أوكسيد الكربون فيها الذي يعمل على تغيير درجةPH الوسط من قاعدي إلى حامضي وبالتالي ولوجود كاشفIndicator خاص مضاف إلى مكونات المزرعة فإن تغيراً في اللون سوف يظهر فيتم قياس اللون الناتج من النمو بواسطة جهاز الطيف الضوئي العادي spectrophotometer .واعطاء نتيجة ايجابية دالة على وجود النمو آلياً.

ملاحظة : تحتاج بعض الأحياء الدقيقة المسببة لتجرثم الدم تقنيات خاصة من أجل عزلها من الدم إذ يمكن أن تعطي مزارع الدم نتيجة سلبية مع وجود الجراثيم فيها والأحياء التالية تحتاج إلى تقنيات خاصة لعزلها من الدم :.

أ - Brucella البروسيلا :

تحتاج أنواع هذه البكتيريا لفترة حضانة طويلة بسبب نموها البطيء بحيث تتراوح فترة الحضانة اللازمة من 4-6 أسابيع قبل إعطاء النتيجة السلبية للزراعة . ويتم مراقبة دلائل النمو وعمل زراعاتsub cultures كل عدة أيام لمتابعة ظهور النمو أو عدمه وتعطى النتيجة السلبية بعد انقضاء الستة أسابيع من الحضانة .

ب- Leptospira :

إن هذه البكتيريا من اللولبيات المتحركة إذ تسبب مرضLeptospirosis للإنسان وتظهر هذه البكتيريا في الإنسان خلال الأسبوع الأول من المرض لذا يتم الكشف عنها فقط خلال الأسبوع الأول من الإصابة إذ تزرع على أوساط خاصة مكونة من الالبيومين والأحماض الدهنية حيث حضن 1-3 قطرات من الدم الكامل المخلوط مع مادةSPS في وسط Leptospira media وحضنه في الهواء لمدة 4-6 أسابيع على درجة حرارة 28 درجة مئوية ثم يتم بعد ذلك فحص النمو على الوسط بواسطة تقنية الحقل المظلم Dark –field techniques .

ج-أنواع Mycobacterium :

تعد بعض أنواع هذه البكتيريا وخاصة النوعين M.avium و M.intracellulare أحد أهم الأسباب التي تسبب تسمم الدم لدى المصابين بالايدز.

وتستخدم تقنية الطرد المركزي التحلليCentrifugation- Lysis لاعداد الدم للزراعة ثم يؤخذ الراسب ويحضن في أوعية خاصة بنظامBactec التي تحتوي على وسط خاص لتنمية هذه البكتيريا وهوMiddle brook media ويحضن الوسط مع نسبة منCO_2 من لمدة 5-10 أيام ثم عمل زراعات sub culture ومسحات مصبوغة بصبغة fast stain- Acid بين فترة وأخرى من الحضانة .

الطرق غير الزراعية المستخدمة في لتشخيص حالة تجرثم الدم :

تستخدم علة طرق غير الزراعة من اجل تشخيص الكائن المسبب لتجرثم الدم وذلك من خلال ما يلي :.

أ-الكشف عن انتجينAntigen البكتيريا أو الاجسام المضادة التي كونها الجسم نتيجة لتجرثم الدم بواسطة الطرق المصلية مثل طريقة التخثرLatex agglutination وطريقة ELISA وغيرها .

ب-استخدام تقنيةPCR للكشف عن العديد من الجراثيم في الدم .

ج-استخدام طريقة الكروماتوغرافيCromatography للكشف عن وجود نواتج الأيض الخاصة بنمو الجراثيم مثل الأحماض الدهنية والسموم .

الباب الثامن

مسحات العين Eye swabs

(Eye culture)

مقدمة :

تعد العين من الأعضــاء المهمــة في جســم الإنســان اذ أن أجزاءهــا الداخليــة والخلفية تكون محمية ومعقمة بشكل طبيعي بينما تكــون الأجــزاء الأماميــة وخاصــة السطحية منها عرضة للهواء والعوامل الميكانيكية الأخرى .لذا يســاعد الدمــعTear على حماية وغسل مقدمة العين (الملتحمةConjunctiva) بسبب احتوائه على مواد قاتلة للجراثيم مثل أنزيمLysozyme الــذي يعمــل علــى تحطيــم الجــدار الخلــوي للبكتيريا ويقوم الجفن والدمع معاً بعملية تعقيم وغسل وتنظيــف مســتمرة لمقدمــة العين مع ذلك فان سطح الملتحمة قد يحتوي على أنواع قليلة من الساكن الطبيعــي غير المرض والتي تكون قد تأقلمت مع المواد القاتلة للجراثيم الموجــودة في الدمــع ومن أمثلتها :

Diphtheroids (coryne bacterium Xerasis)

S. epidermidis

Non-hemolytic streptocooi

Micrococci

التهابات العيون Eye infections :.

تتعرض العين للإصابة ببعض الالتهابات نتيجة أنــواع قليلــة مــن الجراثيــم التي تقاوم تأثير الدمــع المضــاد للجراثيــم وتــأتي التــهابات العيــون مــن مصدريــن رئيسيين هما :

أ – المصدر الخارجي :إذ قد تسبب البكتيريا الموجودة على الجلد كساكن طبيعي أو القادمة مع الهواء التهابات للعين وخاصة في حال تعرض العين للجروح أو الخدوش أو الكدمات أو التحسس أو تدني المناعة بشكل عام .

ب- مصدر داخلي : ينتقل عدد من أنواع الجراثيم عبر الدم أو اللمف وخاصة إلى الأجزاء الخلفية من العين ليكون سبباً في حدوث التهاباتها في بعض الأحيان وتكون أجزاء العين كافة عرضة لحدوث الالتهاب إذ يمكن تقسيم التهابات العين إلى جزئين رئيسيين هما :.

أولا :.الالتهابات الخارجية وهي

أ-التهاب الملتحمة Conjunctivitis

وهو يظهر في العادة تظهر بشكل متقيحPurulent إذ يكون مخاطياً في الألتهاب البكتيري ويكون مائياً في النوع الفيروسي أما النوع الناتج من الكلاميديا فيبدأ على شكل تحوصل وتحبب في الملتحمة . وقد يصاب الأطفال حديثي الولادة بالتهابات ملتحمة العين والناتج من التهاب مجرى الولادة بالعديد من الجراثيم .

ب-التهاب جفن العين Blepharitis

والناتج عادة من أنواع عدة من البكتيريا وخاصة الموجودة كساكن طبيعي على الجلد.

ج-التهاب القرنية Keratitis

تحدث التهابات القرنية في العادة نتيجة لتعرض العين للكدمات أو الجروح في الملتحمة والتي تعتبر من اخطر التهابات العين إذ أنها قد تسبب العمي في فترة زمنية وجيزة وتعتبر البكتيريا هي اكثر أنواع الأحياء الدقيقة شيوعاً في إحداث هذه الالتهابات .

ثانيا الالتهابات الداخلية :.

التي تشمل العين الداخليةEndophthalmitis والناتجة إما من دخول الجراثيم عبر الدم أو اللمف أو مرورها عبر جروح الملتحمة وكدماتها وخاصة بعد العمليات

الجراحية وفي العادة تكون البكتيريا الموجودة كساكن طبيعـي في العـين والجلـد هـي المسـببات الأكـثر شـيوعاً لالتـهابات مـابعد العمليـات الجراحيـة وخاصـة بكتيرياS.aureus وتعتـبر الأحيـاء الدقيقـة التاليـة هـي المسـببات الأكـثر شـيوعاً لالتهابات العيون .

1- البكتيريا :

الأطفل (اقل من سنة)	الأطفل والبالغين
S.aureus Coag.Negative staph Enterobacteriaceae Pseudomonas Neisseria Chlamydia trachomotis	Haemophilus spp S.pneumonia S.aureus Haemolytic streptococci Neisseria Moraxella Enterobactericeae Pseudomonase Chlamydia trachomatis Corynebacterium spp Coag. Negative staphylococci Acinetobacter

2- الفطريات Fungi مثل Candida و Actinomyces

3- الطفيليات Parasite مثل بعض الديدان وToxoplasma

4- الفيروسات Viruses

جمع العينات Specimens Collection :

تعتمد طريقة جمع عينة التهابات العين على مكان وجود الالتهاب فيـها إذ إن كل موقع التهاب معين له طريقة مختلفة في الحصول على العينة وتقسـم طـرق اخـذ عينات التهابات العيون إلى ما يلي :

أ- المسحاتSwabs

يعتبر اخذ مسحةswab من إفرازات العين Eye Discharge هي الطريقة الأكثر شيوعاً لجمع عينات التهابات ملتحمة وجفن العين وخصة عند وجود كمية كبيرة من الإفرازات إذ تستخدم ماسحة قطنيةCotton swab نضبفة ومعقمة لجمع الإفرازات أما في حالات وجودChlamydia فتستخدم ماسحة قطنية جافة مضافاً اليها مادةCalcium alginate حيث يتم اخذ المسحة بالطريقة التالية :.

1- سحب جفن العين السفلي إلى الأسفل .

2- إدخال الماسحة القطنية ثم اخذ العينة من اسفل كيس الملتحمة أو من التقرحات إن وجدت

3- في حال وجود كمية كبيرة من القيحPus يتم إزالته بماسحة معقمة ثم رميها وتؤخذ العينة بماسحة أخرى جديدة .

4- يفضل التعامل مع العينة مباشرة أو وضعها في وسط حفظ ونقل مناسب لحين زراعتها .

ب - الكشط Scraping

يتم اللجوء إلى عملية الكشط scrapin في حالة عدم وجود كمية كبيرة من إفرازات العين إذ تستخدم هنا ملعقة من البلاتينPaltinum sptula لإجراء عملية الكشط من الملتحمة ومن جفن العين ويفضل أن يقوم بعملية الكشط الطبيب المختص.

ج-السحب المباشر Aspiration

يقوم الطبيب المختص بعملية السحبAspiration والتي تستخدم لتشخيص التهابات العين الداخلية أو الدمامل Abscess المغلقة عادة .

نقل وحفظ العينات :.

يفضل التعامل المباشر مع العينات المأخوذة من العين وذلك نتيجة لتعرضها للتلف بسبب وجود أنزيمLysozyme في العينة الذي يؤدي إلى قتل بعض أنواع

البكتيريا كذلك فهي معرضة أيضاً للجفاف السريع لكون عينات العيون في العادة قليلة الحجم .ويمكن أن تبقى الماسحةSwab صالحة للزراعة لمدة ساعتين على درجة حرارة الغرفة ويمكن وتحفظ ان لزم الأمر في الثلاجة بدرجة حرارة 2-8 درجات مئوية أو تنقل في صندوق مبردCooling box لفترة زمنية لا تتجاوز 24 ساعة أما عند الحاجة إلى نقل مسحة العين إلى مختبر قريب فيمكن نقل الماسحةswab في أنبوب اختبار معقم يحتوي على نصف ملليتر من المحلول الملحي الفسيولوجيNormal saline كذلك يجب مراعاة الظروف اللاهوائية أثناء نقل كافة عينات العين ماعدا العينات المأخوذة من الملتحمة .

ملاحظات :

1- يفضل تحديد مكان اخذ العينة من العين بحيث يذكر ذلك في النموذج المرفق مع العينة مثلConjunctiva sample أو Corneal sample ولا يجب استخدام مصطلح عينة من العينEye sample فقط .

2- يجب تحديد من أي عين أخذت العينة هل هي من العين اليسرىLeft eye أو من اليمنى Right eye .

3- يفضل التنسيق بين الطبيب وفي المختبر قبل اخذ العينة من اجل إعداد وتحضير الأوساط المناسبة للزراعة اعتماداً على نوع الالتهاب ومكانة .

4- يفضل اخذ عينتين من مكان الإصابة بواسطة ماسحتين منفصلتين إحداهما تستخدم للزراعة والثانية للفحوصات الأخرى مثل المسحات المصبوغة .

5- يجب اخذ العينة قبل تناول المضادات الحيوية .

6- يتم تعقيم الجفن بطريقة مشابهة لتعقيم الجلد قبل اخذ العينة منه .

الزراعة والتشخيص Culture and Idintification .

يتم التعرف على الكائن المسبب لالتهابات العيون بواسطة عدة خطوات متتالية وهي كما يلي :

1- التحضير الرطب Wet mount

يتم اجراء التحضير الرطب بإضافة 10؟ KOH على العينة المأخوذة من العين للتعرف علي بعض الفطريات مثل Candida وActinonyces .

2- الصبغ Staining

تستخدم عملية الصبغ للتعرف على العديد من مسببات التهابات العيون وتكون العينات المأخوذة بواسطة الكشط أفضل لاجراء عملية الصبغ من تلك المأخوذة بالماسحةswab ويعتبر الصبغ بصبغة غرامG.stan مفيداً للتعرف على معظم أنواع البكتيريا المسببة لالتهابات العيون ما عدا بعض الأنواع مثل الكلاميدياC.trachomatis التي تسبب مرض التراخوماTrachoma حيث يتم التعامل مع العينات المتوقع وجود الكلاميديا فيها بالطريقتين التاليتن :.

أ- الصبغ باليود Iodine أو بصبغة جمسا Giemsa إذ يتم معاملة العينة المأخوذة من الملتحمة بواسطة الكشط بإحدى الصبغتين السابقتين للاستدلال على وجود الكلاميديا ويكون ذلك بمشاهدة أجسام قاعديةBasophilic inclusion Bodies داخل سيتوبلازم الخلايا المأخوذة بعملية بواسطة بالمجهر الضوئي

ب- الصبغات التألقية المناعية المباشرة Direct Immunofluorescent staining :

تعطي هذه التقنية نتائج دقيقة وسريعة لتشخيص وجود الكلاميديا وذلك لأنها تجرى على العينة مباشرة .

الزراعة Culturing

أ-1) تزرع العينات المأخوذة من العيون عادة على وسطي Blood agarو Chocolate agar إذ يعتبر الأخير هو الأفضل لتنمية معظم مسببات التهابات العيون ويفضل زراعة العينة أيضا في الوسط السائل Thioglycolate broth.

2) يحضن وسطBlood agar في Candile Jar تحت الظروف اللاهوائية وخاصة في إصابات العين الداخلية كما ويفضل حضانة الوسطين في ظروف

هوائيـة بوجـود (5-10%)CO2 مـن اجـل المسـاعدة في تشـخيص وتنميـة الأنواع اللاهوائية .

3)يتم مراقبة ظهور النمو بعد 48 ساعة من الحضانة .

ب-يتم زراعة عينة العين للكشف عن الفطرياتFungi على وسطSDA أو وسطBrain- heart infusion إذ تؤخذ العينة بعمليـة الكشـط بواسـطة الملعقة المعدنيةSpatula ثم تزرع على أحد الوسطين السـابقين بعمل قطع في الآجـارAgar علـى شـكل حـرفC (C-shape cut) وثـم تشـخص بواسطة التحضير الرطب .

ج-يفضل اخذ عينة للزراعة من كـلا النوعـين وخاصـة في التـهاب الملتحمـة لتمييز السـاكن الطبيعي عن الكائن المسبب للالتهاب .

د-يجب عمل فحص التحسس البكتيريـا للمضـادات الحيويـةSusceptibility test لأي نمو يظهر على الأوساط الزراعية ويفضل اختيار مضادات حيوية تكون على شكل قطرة أو دهون Cream للعين .

التشخيص وتقييم نتائج الزراعة :.

أ - تعتبر الأنواع البكتيرية الثلاثة التالية:

Staphylococcusو N.gonorrheae و Chlamydia أكثر الأنواع شـيوعاً في التهابات العيون لدي الأطفال حديثـي الـولادةNew born حيـث يظـهر الالتـهاب الناتج منN.gonorrheae في اليوم الثالث إلى الخامس بعد الولادة ويظـهر التـهاب الكلاميديا ما بين اليوم الخامس والرابع عشر بعـد الـولادة بينمـا يظـهر الالتـهاب الناتج منstaph في أي وقت من الحياة علماً إن النوعين الأولـين يسـببان التـهاب الملتحمة لدي الكبار أيضا . حيـث يمكـن تشـخيص الكلاميديـا في العينـة مباشـرة بواسطة صبغة جمساGiemsa أو بالصبغات التألقية المناعية كما بينا سابقاً بينما يتم تمييز بكتيرياNeisseria بعد نموها علـى وسـط chocolate agae بواسـطة صبغـة غرام أو بواسطة فحص Oxidase .

ب- تسبب بكتيريا Moraxella Lacunata التهاب سائل التجويف الأمامي وملتحمة العين وتكون عبارة عن بكتيريا سميكة وقصيرة عصوية مزدوجةDiplobacilli سالبة لصبغة غرام وافضل وسط لزراعتها هو وسطLoefflers media حيث تؤدي إلى عمل حفرة في الوسط بسبب قدرتها على تحليل الجلاتين.

ج- Haemophilus aegyptius وهي عبارة عن بكتيريا عصوية صغيرة سالبة لصبغة غرام مشابهة تماماً في صفاتها لبكتيرياH.influnzae تنمو بشكل جيد على وسطBlood agae وتسبب التهاب الملتحمة الوبائي والذي يسمى . Pink eye

د- تسبب بكتيرياC.diphtheria مرض التهاب الملتحمة ذا الغشاء الكاذبPseudo membranous Conjunctivitis التي يفضل زراعتها على وسطLoefflers media و Pai media وتشخص أيضا من خلال إنتاجها للسموم بواسطة فحص Elek test .

هـ- تنتج التهابات العين الداخلية عادة بعد العمليات الجراحية وخاصة بعد عملية إزالة الماء الأزرقCataract عادة .وتعتبر S.aureas هي المسبب الشائع لالتهابات العين الداخلية كما وقد تعملS.epidermedia على إحداث هذا الالتهاب أيضا.

الباب التاسع

مسحات الأذن Ear swabs

(Ear infection)

مقدمة :

تتعرض الاذن كغيرها من اعضاء الجسم لحدوث التهابات متعددة تسببها البكتيريا والفطريات وتنتج التهابات الاذن بشكل عام من مصدرين رئيسين هما :.

أ- مصدر خارجي عبر صيوان الاذن وقناة السمع وهذا غالباً يكون مصدراً لالتهاب الاذن الخارجية Otitis Externa .

ب- مصدر داخلي وهو قدوم المسبب من التجويف الفمي والانفي عبر قناة استاكيوس اذ تؤدي التهابات التجويف الانفي والفمي غالباً الى حدوث التهابات الاذن الوسطىOtitis media وقد ينتقل الالتهاب عبر افرازات الاذن الوسطى مسبباً التهاب الاذن الخارجية .

وتعتبر الانواع التالية المسببات الاكثر شيوعاً لالتهابات الاذن الخارجية External ear infection .

S.aureus	S.pyogenes
Pseudomonas aeruginosa	Vibrio spp
Aspergillus (Fumigatus ,Niger)	Candida spp

اما المسببات الشائعة لالتهبات الاذن الوسطىOtitis media) Middle ear) فهي .

S.pneumonia	S.pyogenes
H.influenzae	S.aureus

Hemolytic streptococci	Moraxella Catarrhalis
P.aeruginosa	E.coli
Proteus	

وانواع اخرى من Coliforms Bacteria, Aspergillus, Candida

اما اهم الانواع التى تسبب التهاب الاذن الوسطى المزمنChroic فهي.

Bacteroides	Fungi
Anaerobic bacteria	enteric bacilli

وتعد الانواع التالية كمسببات انتهازية وغير شائعة لالتهابات الاذن بشكل عام :.

Fusobacterium	Coag.Negative staph
Micrococc	Diphtheroids
Bacillus spp	C.diphtheriae
Mycobacterium spp	Mycoplasma pneumoniae
Saprophytic Fungi	Actinomyces

وفي بعض الحالات يؤدي تناول كمية كبيرة من المضادات الحيوية لمعالجة التهاب الاذن الوسطى المزمنChronic الى حدوث العظمة الموجودة خلف الاذن (الخشاء)Mastoiditis ويسبب هذا الاتهاب في العادة أنواعاً متعددة من البكتيريا اللاهوائية anaerobic bacteria .

جمع العينات Specimen Collection :

١- الاذن الخارجية External ear :

تعتبر التهابات الاذن الخارجية مشابهة لالتهابات الجلد اذ يفضل تعقيم الاذن الخارجية بشكل جيد بمحلولBenzyl konium chloride بتركيز1000/1 او بكحول

70٪ وباليود 2٪ للتخلص من الساكن الطبيعي الموجود على الجلد ومنع تلوث العينة بها ثم بواسطة ماسحة قطنية معقمة steril cotton swab يتم اخذ المسحة بعملية التدوير الشديد من التقرح او الأفرازات ان وجدت .

2- الاذن الوسطى Middle ear :

ويفضل ان يقوم الطبيب المختص او الجراح بأخذ الافرازات الناتجة من الالتهاب بواسطة عملية السحب (البزل) Aspiration إلا أنه يتم اللجوء في بعض الحالات الى أخذ مسحة من الافرازات التي تكون في قناة السمع ويفضل في هذه الحالة تعقيم قناة السمع وازالة الفرازات بماسحة واخذ العينة بماسحة swab صغيرة اخرى لتقليل التلوث الجرثومي للعينة والناتج من البكتيريا الموجودة أصلاً كساكن طبيعي في القناة السمعية .

نقل العينات Specimens Transport:

تبقى مسحات وعينات الاذن صالحة للزراعة لمدة لاتزيد عن ساعتين على درجة حرارة الغرفة ويمكن حفظها في الثلاجة لمدة لاتزيد عن 24 ساعة .وتستخدم عدة اوساط حفظ ونقل مثل وسط amies transport media الذي يحفظ العينة لمدة لا تزيد عن 24 ساعة ويجب توفير ظروف لا هوائية في عملية النقل وخاصة للعينات المسحوبة من الأذن الوسطى(Aspiration) .

الزراعة والتشخيص Culture and Idintification :

تقسم الفحوصات التي تجرى على العينة المأخوذة من الأذن الى قسمين :.

1 - الفحص المباشر ويتضمن ما يلي :

أ -التحضير الرطب Wet mount:

ويستخدم للكشف عن الفطريات عادة بانواعها المسببة للالتهابات الاذن بشكل عام بعد خلط العينة مع 10% KOH لمشاهدة الابواغ او الخيوط الفطرية

ب- اجراء صبغة غرام Gram stain لمسحة smear من العينة مباشرة من اجل التعرف على بعض صفات البكتيريا المسببة للإلتهاب .

جـ- الفحوصات المصلية مثل فحص التخـثر Latex agglutination والمستخدم عادة للكشف عن انتجينات S.pneumonia في العينة مباشرة كما ويستخدم الفحوصات التألقية المناعية (Radioimmuno assay RIA) للكشف أيضاً عن انتجينات العديد من البكتيريا مثلH.influnzae

الزراعة Culturing :

أ - تزرع المسحات المأخوذة من الاذن في العادة على وسطيBlood agar وMacConkey agar وتحضن الاوساط في ظروف هوائية على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وفي حال ظهور النمو يتم دراسته من الناحية الشكلية والصفات الكيميائية الحيوية و المصلية ثم يتم اجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية .

ب- من اجل عزلH.influenzae عند الاطفال خاصة يتم زراعة العينة على وسط Chocolate agar ويحضن في جو يحتوي على نسبة 5-10 CO_2 % ثم يتم متابعة ظهور النمو لمدة 48 ساعة .

ج - اما في حالة الاصابة المزمنة او التهاب عظمة خلف الاذن يتم حقن العينة في وسط Blood agar مع اضافة بعض المضادات الحيوية مثل Kanamycin للتخلص من البكتيريا الملوثة للعينة ثم يحضن الوسط لمدة 48 ساعة في ظروف لا هوائية.

د - من اجل عزل الفطريات تحقن العينة في وسط SDA وتحضن على درجة حرارة الغرفة ثم يراقب ظهور النمو لمدة ستة ايام .

الباب العاشر

مسحات الجروح والحروق

Wounds and Burns Swabs

مقدمة :

يلعب الجلد دوراً مهماً في حماية الجسم من المؤثرات الخارجية وهو يعتبر خط الدفاع الأول وجزءاً مهماً من جهاز المناعة العام في الجسم إذ تكمن قدرته في حماية الجسم على وجود طبقة الكيراتين Keratin المغلفة لطبقة البشرة المكونة بدورها من خلايا عديدة متراصة والتي تعمل مجتمعة على حماية الأنسجة المهمة و التالية للبشرة من تأثير العديد من العوامل الفيزيائية و الكيميائية و الجرثومية وتعتبر الجروح الميقة Deep wounds أو السطحية Surfase و الحروق Burns بأنواعها من أهم الأمثلة على العوامل التي تسبب تلف هذا الخط الدفاعي المهم للجسم .

ويحتوي سطح الجلد في الوضع الطبيعي على عدد كبير من الجراثيم الموجودة كساكن طبيعيNormal Flora والتي تكون أحد أهم مصادر التهابات الجروح والحروق، وان تعرض الجلد للكدمات أو التشقق أو العمليات الجراحية أو الحروق يتيح المجال لحدوث الألتهابات بأنواعها والي تنتج في العادة من عدة أنواع مجتمعة من الجراثيم الهوائيةaerobic و اللاهوائيةanaerobic أو الاختياريةFacultative حيث تفضل الأنواع اللاهوائية عادة الجروح العميقة .

وتعتبر الأنواع الجرثومية التالية المسببات الأكثر تكراراً في التهابات الجروح و الحروق المفتوحة Open Wounds and Burns:

Staph .aureus	Hemolytic Streptococci
Staph . epidermadis	Bacteroidis
Micrococcus	Clostridium spp
Stre.Pyogenes	Pseudomonas spp
E.Coli	Dermatophytes Fungi
Diphtheroids	Anaerobic Streptococcus
Proteus	Fusobacterium
Enterococci	Klebsiella

أما الأنواع التالية فهي من المسببات قليلة الوجود في التهابات الجروح والحروق بشكل عام :

Mycoplasma .spp	Blastomyces
Haemophilus spp	Actinomyces
Mycobacterium spp	Candida
Bacillus	Nocardia
C.diphtheriae	Neisseria
Yersinia	Brucella
	Salmonella
	Aspargillus
	Cryptococcus

جمع ونقل العينات Specimens Collection and Transport :

يتم جمع عينات التهابات الجروح والحروق بعدة طرق اعتماداً على حالة الالتهاب وطبيعته وأهم طرق جمع هذه العينات هي :.

wound cultures

surface wounds

deep wounds

طريقة جمع ونقل عينات الجروح والحروق

1- المسحات Swabs :.

تعتبر المسحات هي الطريقة الشائعة لجمع عينات الجروح والحروق ومن اجل جمع عينة مناسبة وسليمة يفضل اتباع ما يلي :.

أ- تعقيم مكان أخذ العينة بشكل جيد وذلك لتلافي تلوث المسحة بالبكتيريا الموجودة كساكن طبيعي على الجلد .

ب- بواسطة ماسحة قطنيةcotton swab معقمة يتم أخذ العينة من عمق مكان الالتهاب وليس من سطحه .

ج- في حالة الالتهابات المغلقة يتم فتح الالتهاب بواسطة إبرة Needle أو واخزة Lancet ثم اخذ المسحة بشكل جيد وبظروف معقمة .

2- السحب (البزل) Aspiration :.

تستخدم هذه الطريقة في حالة الالتهابات المتقيحة والعميقة إذ يجب تعقيم الجلد بشكل جيد ثم أخذ القيحPus بواسطة إبرة معقمة .

ويمكن استخدام عملية الكشط Scraping في حالة الالتهابات التي لا تحتوي على قيحPus وتظهر هذه الحالة عادة في الألتهابات الفطرية السطحية Dermatophytes .

النقل Transport :

يفضل نقل المسحة بسرعة إلى المختبر ويمكن أن تحفظ في الثلاجة على درجة حرارة 2-8 درجات مئوية لفترة لا تزيد عن ساعة واحدة . أماعينات الكشط Scraping التي تستخدم للكشف عن الفطريات فتحفظ وتنقل على درجة حرارة الغرفة فقط .ويفضل أن تنقل المسحات بظروف هوائية أما العينات المأخوذة بواسطة عملية السحب Aspiration فيجب نقلها لا هوائياً باستخدام حقيبة خاصة بذلك anaerobic bag أو بواسطة السيرنج Syringe على أن يبقى مغلقاً بشكل جيد .

ويمكن استخدام أوساط نقل مثل وسط Cary-Blair media أو وسط Amies مع توفير الظروف اللاهوائية عند نقل العينات المأخوذة بواسطة السحب (البزل) Aspiration .

فحص العينات Specimens Examination :.

تمر عملية فحص العينات بالخطوات التالية :.

1- الفحص الظاهري Maroscopic Exam:

يمكن أن يعطي لون أو رائحة أو قوام عينة القيح Pus دلائل قد توجه عملية التشخيص فمثلاً تعطي الجراثيم اللاهوائية في العادة لوناً بنياً للقيح وقد يدل القيح الأزرق على وجود بكتيريا P.aeruginosa أما الرائحة الكريهة للقيح فهي دلالة على أن سبب الالتهاب هو بكتيريا لا هوائية مثل بكتيريا C.perfringens .

الفحص المجهري Microscopic Exam. :.

أ - التحضير الرطب Wet mount .

يفيد التحضير الرطب لعينات الجروح والحروق عندما تكون الفطريات هي مسبب الالتهاب إذ يمكن مشاهدة الابواغ أو الخيوط الفطرية تحت المجهر .

ب- صبغة غرام Gram stain .

يفضل عمل مسحة smear من العينة وصبغها بصبغة غرام وهذا يساعد في اختيار أوساط الزراعة اعتماداً على نوع الجرثومة التي قد تظهر في المسحة smear وقد أشارت بعض الدراسات الى أن احتواء المسحة المصبوغة على كمية من الخلايا الطلائية الحرشفية المغطية للجلد قد يكون دليلاً على تلوث العينة ويمكن عمل مسحةsmear وصبغة مباشرة بصبغات تألقية مثل صبغة auramine stain للتعرف على الكائن المسبب للالتهاب .

3- الزراعة Culturing :.

يفضل زراعة عينات الجروح والحروق بشكل روتيني على الأوساط التالية :.

- وسطين من Blood agar .
- Neomycin blood agar .
- MacConkey agar .

- Cooked meat media .
- Thioglycolate broth

أ - يحضن وسط Blood agar و MacC. هوائياً مع وجود 5-10 % CO_2 على درجة حرارة 37 درجة مئوية .

ب- ويحضن وسط Blood agar الثاني ووسط Neomycin B.A. لا هوائيا على درجة 37 درجة مئوية ويراقب ظهور النمو خلال 2-3- أيام .

ج- يحضن وسط Cooked meat media لمدة 4-5 أيام على درجة 37 درجة مئوية ثم يراقب ظهور النمو على سطح الوسط إذ أن هذا الوسط يعتبر وسطاً غنياً يساعد في نمو الأنواع الهوائية واللاهوائية من البكتيريا .

د - ويمكن استخدام أوساط زراعية أخرى مثل Chocolate agar عند الشك بوجود H.influenzae أو وسطSDA لتنمية الفطريات .

هـ - يفضل زراعة المسحة swab بشكل عام تحت الظروف الهوائية أما العينات المأخوذة بالسحبAspiration أو المأخوذة من التقرحات المغلقة أو الجروح العميقة فيفضل نقلها وزراعتها تحت الظروف اللاهوائية .

وبشكل عام يجب عدم زراعة العينات التالية لا هوائياً :

1- المسحات المأخوذة من اللوزتين ، الأنف ، الأحليل ، الرحم ، المهبل ، المستقيم، الملتحمة ، الأذن الخارجية ، الجلد ، الجروح والحروق السطحية .

2- العينات مثل البلغم ، البول ، البراز ، ومحتويات الامعاء .

الباب الحادي العاشر

سوائل الجسم Body Fluids

مقدمة :

يحتوي جسم الإنسان على أنواع متعددة من السوائل غير الدم والسائل النخاعي الشوكي واهم السوائل الجسمية هي :

1- سوائل المفاصل Synovial or Joint fluids

2- السائل البلوري المحيط بالرئة Pleural fluid

3- السائل المحيط بالقلب Pericardial fluid

4- سائل البطن Peritoneal fluid

التي تعتبر جميعها سوائل معقمة لوجودها بكميات قليلة في تجاويف جسمية مغلقة إلا أن وجود أي بكتيريا فيها هو دليل على وجود الالتهاب وقد تشكل هذه البكتريا خطراً على حياة الشخص المصاب كما أن زيادة كمية السائل في تجويفه الخاص يؤدي إلى أعراض ودلائل معينة تشير إلى بعض الحالات المرضية أو إلى الالتهابات .

وتظهر السوائل الجسمية الملتهبة عادة بشكل متقيح Purulent لوجود كميات كبيرة من كريات الدم البيضاء Pus cells فيها وتعتبر الأنواع البكتيرية التالية من أهم مسببات التهابات سوائل الجسم .

1- سوائل المفاصل :

1

S.aureus
S.pyogenes
Streptococcus
Neisseria

وأنواع أخرى من Anaerobic bacteria

2- السائل المحيط بالرئة :

M.tuberculosis
S.pneumonia
Coag.positive Staphylococcus
H.influenzae
Actinomyces (Fungi)

أنواع أخرى من Streptococcus

3- السائل المحيط بالقلب :

مجموعة Enterobacteriaceae
Staphylococcus
Streptococcus
S.pneumonia
Salmonella
Shigella
Neisseria

سائل البطن :

E.coli
S.pneumonia
S.Faecalis
Klebsiella
S.aureu
Coag .Negative Staphylococci
Candida
Proteus
Diphtheroids
Bacteroides Fragilis
Streptococcus(group A,B)
Viridans streptococcus
C.perfringens
Micrococci
Pseudomonas
Anaerobic bacteria

الجمع النقل Specimens Collection and Transport

يتم جمع سوائل الجسم بواسطة الطبيب المختص إلا أنة يجب تعقيم الجلد بشكل جيد قبل اخذ العينة باليود2 ٪ والكحول 70٪ ثم إجراء عملية السحب Aspiration بواسطة إبرة معقمة حيث يفضل سحب حوالي 3-10 ملليتر من

السائل ثم وضع العينة في أنبوب يحتوي على مادة مانعة للتخثر مثلEDTA أو الهيبارين أو SPS مع مراعاة ظروف التعقيم في كافة مراحل العمل .ويفضل التعامل مع سوائل الجسم بسرعة من حيث إجراء الفحوصات أو الزراعة لأنها تبقي صالحة للزراعة لمدة ساعتين على درجة حرارة الغرفة ويمكن أن تحفظ في الثلاجة وتنقل في صندوق مبرد Cooling box لمدة لا تزيد عن 24 ساعة ويفضل أيضاً نقل عينات سوائل الجسم في جو يحتوي على نسبة عالية من ثاني أوكسيد الكربون أو نقلها لا هوائياً وخاصة عينة سوائل المفاصل .

الفحوصات المخبرية Lab . Examination:

يمكن إجراء عدة فحوصات مخبرية على سوائل الجسم للاستدلال من خلالها على الالتهاب أو على حالات مرضية أخرى تساعد الطبيب للوصول إلى التشخيص وإعطاء المناسب وأهم هذه الفحوصات التي تجري على سوائل الجسم هي:

1- **الفحص الظاهري** Appearance،

تكون سوائل الجسم في العادة صافية وشفافة إلا أن ظهور العكورة فيها قد يكون دليلاً على الالتهاب وقد تظهر كريات الدم الحمراء في السائل المحيط بالرئة في حالة الإصابة بالسل .

2-**عد كريات الدم البيضاء** White blood cell count ،

يمكن استخدام السائل المخلوط مع مادة مانعة للتخثر من اجل عد كريات الدم البيضاء إذ أن وجود اكثر من 300 كرية دم بيضاء لكل ملليتر واحد من السائل ذو دلالة مهمة على وجود الالتهاب ويمكن إجراء عملية العد التفريقي لكريات الدم البيضاء في مسحةsmear مصبوغة من السائل من اجل الاستدلال على نوع الكائن المسبب إذ أن وجود كريات الدم البيضاء متعددة الانوية Polynuclear cells بشكل سائد في المسحة smear دليل على الالتهاب البكتيري أما وجود كريات الدم البيضاء اللمفية Lymphocytes بشكل سائد فهذا دليل على الالتهاب الفيروسي .

3-الفحوصات الكيميائية Chemical examination :

يمكن من خلال إجراء بعض الفحوصات الكيميائية على سوائل الجسم التعرف على وجود أو عدم وجود الالتهاب الجرثومي والجدول التالي يبين بعض الفحوصات الكيميائية ونتائجها الدالة على الالتهاب .

الفحص	النتيجة في حالة وجود الالتهاب
البروتين	أكثر من 3 g/dl
أنزيم LDH	يزداد
السكر	ينخفض خاصة في الإصابة البكتيرية
الكثافة النوعية specific gravity	اكثر من 1.018
Lactic acid	يزداد خاصة في التهاب المفاصل البكتيري

ويساعد الفحص الأخير Lactic acid في التمييز بين حالة الروماتيزم أو تآكل المفاصل وبين حالة الالتهاب البكتيري إذ يكون منخفضاً أو طبيعياً في حالات الروماتيزم وتآكل المفاصل .

4-الفحوصات الجرثومية Microbiological examination

يتم إجراء عملية الطرد المركزي لمدة 10 -15 دقيقة على السائل الجسمي المأخوذ إذا كان صافياً غير متعكر ثم يؤخذ الراسب لإجراء الفحوصات الجرثومية أما إذا كان السائل عكراً فيتم إجراء الفحوصات علية مباشرة وهي كما يلي :.

أ- صبغة غرام Gram stain :

يتم عمل مسحةsmear وصبغها بصبغة غرام للتعرف على النوع البكتيري المسبب للالتهاب .

ب-التحضير الرطب Wet mount :

يمكن من خلال التحضير الرطب الكشف عن وجود الفطريات وكريات الدم البيضاء مباشرة في العينة .

ج- الزراعة Culturing .

1- يفضل زراعة عينة سوائل الجسم روتينياً على الأوساط التالية :.

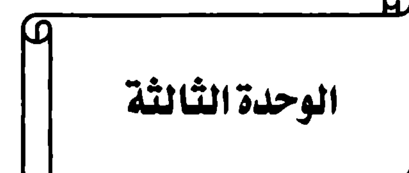
- وسطين من Blood agar
- وسط Chocolate agar
- وسط سائل مثل Thioglycolate broth أو Cooked meat broth أو Trypticase soy broth

2- يحضن وسط Blood agar ووسط Chocolate agar في ظروف هوائية بوجود 5-10٪ CO2 على درجة حرارة 37 درجة مئوية ويراقب النمو لمدة 3-4 أيام قبل إعطاء النتيجة السلبية .

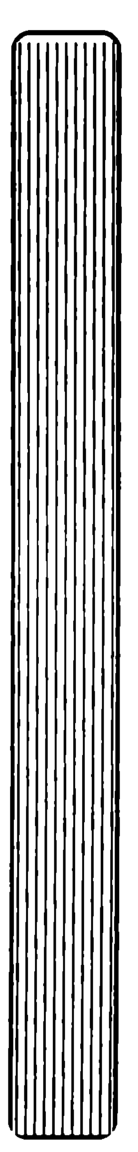
3- يحضن وسط Blood agar الثاني في ظروف لا هوائية ويتم مراقبة ظهور النمو لمدة أسبوعين .

4- في حالة عدم ظهور النمو على الأوساط الصلبة يتم عمل إعادة الزراعة Sub culture من الأوساط السائلة على أوساط صلبة جديدة حيث تستخدم الأوساط السائلة هنا لزيادة عدد البكتيريا التي قد تكون موجودة بأعداد قليلة في العينة أصلاً ويعتبر وسط Trypti case soy broth مفيداً في عزل مكورات السيلان gonococci في المفاصل أما وسط Cooked meat broth فهو من افضل أوساط تنمية الجراثيم اللاهوائية .

5- يمكن زراعة العينات وخاصة سوائل ما حول الرئة والقلب على وسط L.J.media للكشف عن بكتيريا السل أو على SDA لتنمية الفطريات الجهازية Systematic Fungi.







الملاحق

الملحق (1)

فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية

Susceptibility test (Sensitive test)

يعتبر فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية (وهو قياس مدي تأثير أنواع عدة من المضادات الحيوية على بكتيريا معينة) من الأمور المهمة والتي يجب إجراؤها دائماً بعد عزل الكائن المسبب للمرض،من أجل إختيار المضاد الحيوي الأنسب و الأفضل لعلاج الالتهابات .ونتيجة لتعدد أنواع المضادات الحيوية المصنعة وبسبب ظهور سلالات جرثومية مقاومة لبعض أنواع المضادات الحيوية يتم اللجوء إلى إجراء هذا الفحص من اجل مساعدة الطبيب في اختيار العلاج المناسب ودراسة إنتشار السلالات الجرثومية المقاومة للمضادات الحيوية وخاصة الأنواع المهمة والمؤثرة في صحة المجتمع .

ويتم اجراء فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية بشكل عام بطريقتين هما :.

1-طريقة التخفيف Dilution method .

والتي تعتمد بشكل مختصر على تحضير تخافيف متدرجة تصاعدياً من المضاد الحيوي ثم حقنها بمعلق قياسي (معياري) Standard suspension من البكتيريا المراد اجراء الفحص عليها ليتم مراقبة تأثير المضاد الحيوي على البكتيريا من خلال تثبيط أو قتل النمو البكتيري . وبالرغم من أن هذه الطريقة تعتبر أكثر حساسية ودقة من غيرها إذ يمكن من خلالها مباشرة ايجاد الحد الأدني للتركيز المثبط (MIC)

إلا أنها غير شائعة الاستخدام وذلك لأنها تحتاج إلى وقت طويل وكمية كبيرة من المواد لاجرائها .

وتتم عملية التخفيف هنا بطريقتين :

أ-طريقة الانابيب Broth tube dilution .

حيث يتم أخذ كمية محددة من المضاد الحيوي المراد استخدامة ثم عمل تخافيف متدرجة تصاعدياً في أنابيب تحتوي على وسط غذائي سائل وبعد ذلك يتم حقن كمية محددة من المعلق البكتيري القياسي المحضر للبكتيريا المراد اجراء الفحص عليها في كل انبوب .

وبعد فترة الحضانة التي تتراوح من 18-24 ساعة يتم مراقبة وجود النمو في الانابيب من خلال ظهور العكورة أو اختفائها ليتم من خلال هذه الطريقة تحديد أقل تركيز للمضاد الحيوي الذي أدي إلى ايقاف النمو البكتيري .

ب-طريقة الآجار Agar plate dilution .

تشابه هذه الطريقة طريقة الانابيب السابقة ولكن يستخدم هنا وسط صلب وهو في العادة وسط Mueller-Hinton agar.ويتم إجراء الفحص بالطريقة التالية :.

-تحضير عدة تخافيف للمضاد الحيوي في أنابيب اختبار منفصلة .

-تحضير وسط M.H agar و وضعة في الحمام المائي على درجة 50 درجة مئوية ليبقي ذائباً

-مزج حجم محدد من كل تخفيف مع حجم محدد من الوسط جيداً في طبق منفصل ثم تركها لتتصلب .

-حقن كل وسط بحجم محدد من المعلق البكتيري القياسي بحيث ينشر المعلق على سطح الوسط بشكل كامل ومتساوي .

-حضن الأوساط على درجة 37 درجة مئوية لمدة 18-24 ساعة .

-مراقبة ظهور النمو وتحديد أقل تركيز أدي الى عدم ظهور النمو البكتيري .

ملاحظة:.

يقارن المعلق البكتيري المعياري المناسب لإجراء الفحص بما يعادل نصف (0.5) من تركيز محلول MC-farland.القياسي (المعياري) ويحضر محلول MC-farland المعياري من:

- 99.5 مليلتر من 1%من حامض الكبريتيك Sulfic acid.
- 0.5 مليلتر من 1.175% من كلوريد الباريوم Barium chlorid والذي يعطي محلول سلفات الباريوم Barium sulfate ذو الكثافة الضوئية المحددة Obtical densityويعتبر المعلق البكتيري المحتوي على 1.5×10^{18} خلية بكتيرية لكل ملليتر واحد مساوياً لنصف تركيز محلول MC-farland المعياري .

2- طريقة قرص الانتشار Disk diffusion method .

تعتبر هذه الطريقة الأكثر إنتشاراً وشيوعاً من سابقاتها في المختبرات لسهولة وسرعة اجرائها وقلة تكلفتها وهي ما تسمى بطريقة Kirby –Bauer ،والتي تعتمد في نتيجتها على قياس حلقة التحلل أو تثبيط النمو حول قرص المضاد الحيوي على الوسط الصلب إذ يتم من خلال ذلك تحديد نوع المضاد الحيوي الأنسب و الأكثر فعالية للجرثومة المستخدمة في الفحص . وتتم هذه الطريقة كما يأتي:

1- بواسطة حلقة معدنية يتم أخذ جزء من النمو البكتيري وحقنة في أنبوب يحتوي على 5 ملليتر من وسط سائل ثم حضن الوسط على درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 4 ساعات أو أكثر حتي يظهر النمو على شكل عكورة في الوسط ثم تقارن العكورة مع محلول MC-farland المعياري حيث يجب أن يعادل تركيز النمو مقدار نصف تركيز محلول MC-farland المعياري .

2- يتم أخذ جزء من الوسط السائل بواسطة ماسحة قطنية معقمة ويفرد بشكل متساوي على الوسط الصلب وهو وسط Mueller Hinton agar.

3- بواسطة ملقط معدني معقم يتم وضع عدة أقراص لعدة أنواع من المضادات الحيوية (8-12 قرص) على سطح الوسط الزراعي الصلب مع ترك مسافات

مناسبة بين كل قرص وآخر . إذ يفضل وضع الأقراص على الوسط الصلب خلال مدة زمنية لا تتجاوز 15 دقيقة بعد النمو علية حتى لا تتكاثر البكتيريا وتقلل من فعالية المضاد الحيوي .

4- يتم حقن الطبق على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 18-24 ساعة ثم قراءة النتيجة وملاحظة التحلل حول أقراص المضادات الحيوية .

وتعتمد فعالية طريقة قرص الانتشار على علة عوامل هي:

1- نوع وتركيز المضاد الحيوي في القرص المستخدم .

2- مدى صلاحية وطريقة حفظ أقراص المضادات الحيوية المستخدمة إذ أن بعضها مثل أقراص مجموعة السيفالوسبورين يجب أن تحفظ بدرجة حرارة أقل من 14 درجة مئوية .ويمكن أن تبقى صالةً تحت الاستخدام في الثلاجة لمدة أسبوع واحد بينما الأنواع الاخرى مثل مجموعة البنسليات فهي تحفظ مبردة على درجة حرارة 4-5 درجات مئوية

3- نوع وعمر الوسط المستخدم وعمق الاحار فيه : ويعتبر وسط M.H .agar هو أكثر وأفضل الأوساط استخداماً وشيوعاً في هذه العملية إذ يفضل أن يكون بعمق حوالي 4ملم ويتم استخدامة في فترة لا تتجاوز الاسبوع من إعداده .

4- نوع وعدد البكتيريا المستخدمة : يجب مطابقتها بكثافة محلول MC-farland المعياري لتعطي نتائج سليمة ودقيقة .

5- درجة حرارة ومدة الحضانة : تحضن الأطباق عادة على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 18-24 ساعة .

6- معدل نمو البكتيريا وحساسيتها للمضاد الحيوي .

7-درجة ذائبية المضاد الحيوي وانتشاره على سطح الوسط الصلب .

ملاحظات:

1-يفضل استخدام طريقة التخفيف للبكتيريا بطيئة النمو حيث لا تعطى طريقة قرص الانتشار نتائج دقيقة ومعتمدة .

2-عند اجراء فحص الحساسية لبكتيريا Streptococcus أو بكتيريا Pneumonia يجب إضافة كمية من الدم الى الوسط للمساعدة في نمو هذه الأنواع . أما عند إجراء هذا الفحص لبكتيريا Haemophilus فيجب إضافة 1% هيموجلوبين للوسط أو اجراء الفحص على وسط Chocolate agar .

3-يتم قراءة نتيجة الفحص لقياس قطر حلقة التحلل حول قرص المضاد الحيوي بالملليمتر Millimeter.

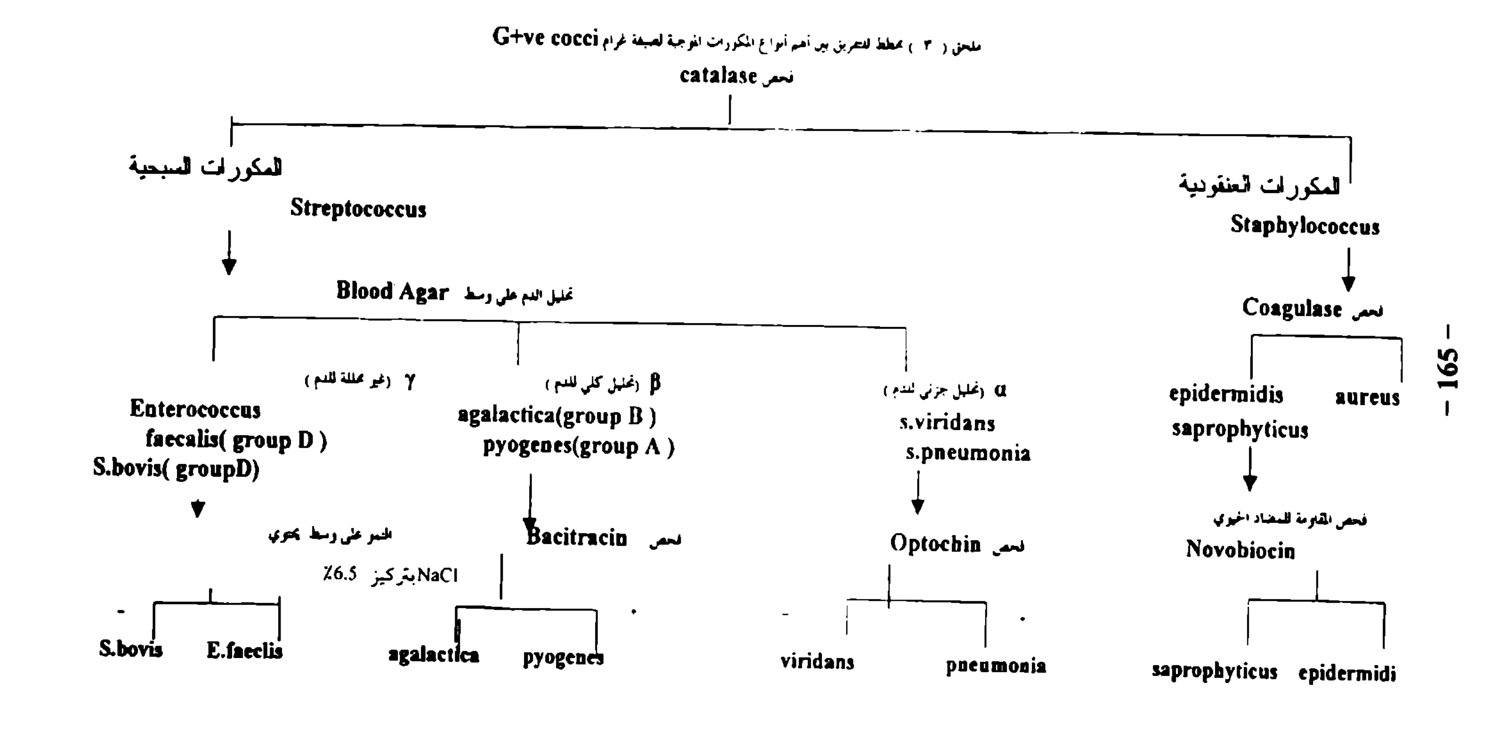
4- لا يمكن الحكم على فعالية المضاد الحيوي تجاه البكتيريا من خلال ظهور حلقة التحلل فقط وإنما يجب ان تكون حلقة التحلل أكبر من قطر معين خاص بنوع المضاد وتركيزه في القرص ويكون ذلك كما في الجدول التالي مثلاً:

المضاد الحيوي	تركيز المضاد في القرص	قطر حلقة التحلل بالمليمتر	
		المقاومة Resistant	الحساسية Sensitive
Ampicllin	10 mg	أقل من 11	12 أو أكثر
Novobiocin	30 mg	أقل من 17	18 أو أكثر
Gentamycin	10 mg	أقل من 12	13 أو أكثر
Erythromycin	15 mg	أقل من 13	14 أو أكثر
Bacitracin	10 mg	أقل من 8	9 أو أكثر
Penicillin G	10 mg	أقل من 20	21 أو أكثر

الملحق (2)

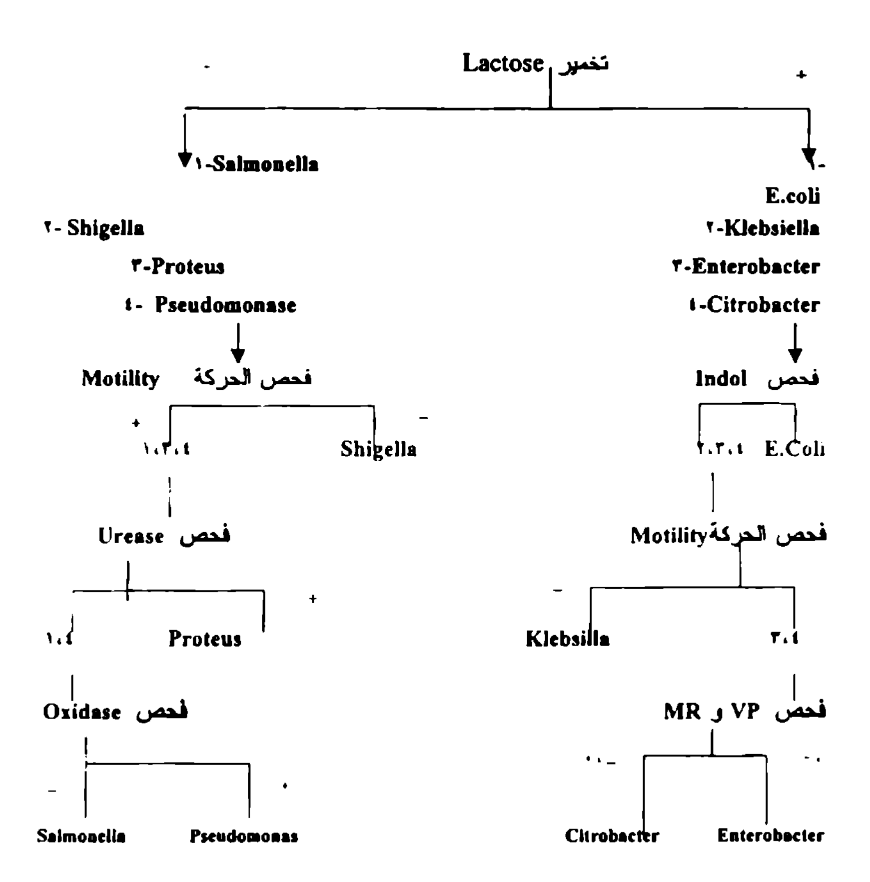
أهم الأوساط المستخدمة في تنمية البكتيريا:

الوسط	نوعه	استخدامه
Blood agar	غني ومفرق	تنمية معظم أنواع البكتيريا المهمة طبياً والتفريق بين المحللة وغير المحللة للدم .
Chocolate agar	غني	تنمية معظم أنواع البكتيريا التي تحتاج الى ظروف غذائية خاصة مثل Neisseria و Haemphilus والانواع اللاهوائية .
MacConkey agar	مفرق واختياري	تنمية البكتيريا السالبة لصبغة غرام والتفريق بين الانواع المخمرة وغير المخمرة للاكتوز .
Thioglycollate media	غني	تنمية وتكثير وحفظ معظم أنواع البكتيريا
Thayer-martin agar	غني واختياري	تنمية بكتيريا Neisseria .
Lowenstin-Jensen media	غني واختياري	تنمية بكتيريا السل .
S-S agar	غني ومفرق	تنمية وتفريق بكتيريا Salmonella عن Shigella .
Mueller -Hinton agar	بسيط	يستخدم لإجراء فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية .
TCBS	مفرق وغني	للتفريق بين أنواع بكتيريا الكوليرا .
Blood agar مع Colistin و Nalidixic acid	اختياري	تنمية البكتيريا الموجبة لصبغة غرام فقط.
Blood agar مع kanamycin و vancomycin	اختياري	تنمية البكتيريا اللاهوائية العصوية السالبة لصبغة غرام .
Charcoal Yeast extract agar	غني واختياري	تنمية بكتيريا Legionella .
Phenyle ethyl alcohal Blood agar	غني	تنمية الأنواع اللاهوائية والاختيارية الكروية الموجبة لصبغة غرام .


ملحق (٣) مخطط للتفريق بين أهم أنواع المكورات الموجبة لصبغة غرام G+ve cocci
فحص catalase
المكورات السبحية
Streptococcus
المكورات العنقودية
Staphylococcus
تحليل الدم على وسط Blood Agar
فحص Coagulase
γ (غير محللة للدم)
Enterococcus
faecalis(group D)
S.bovis(groupD)
β (تحليل كلي للدم)
agalactica(group B)
pyogenes(group A)
α (تحليل جزئي للدم)
s.viridans
s.pneumonia
epidermidis
saprophyticus
aureus
النمو على وسط يحتوي
NaCl بتركيز 6.5%
فحص Bacitracin
فحص Optochin
فحص المقاومة للمضاد الحيوي
Novobiocin
S.bovis
E.faeclis
agalactica
pyogenes
viridans
pneumonia
saprophyticus
epidermidi

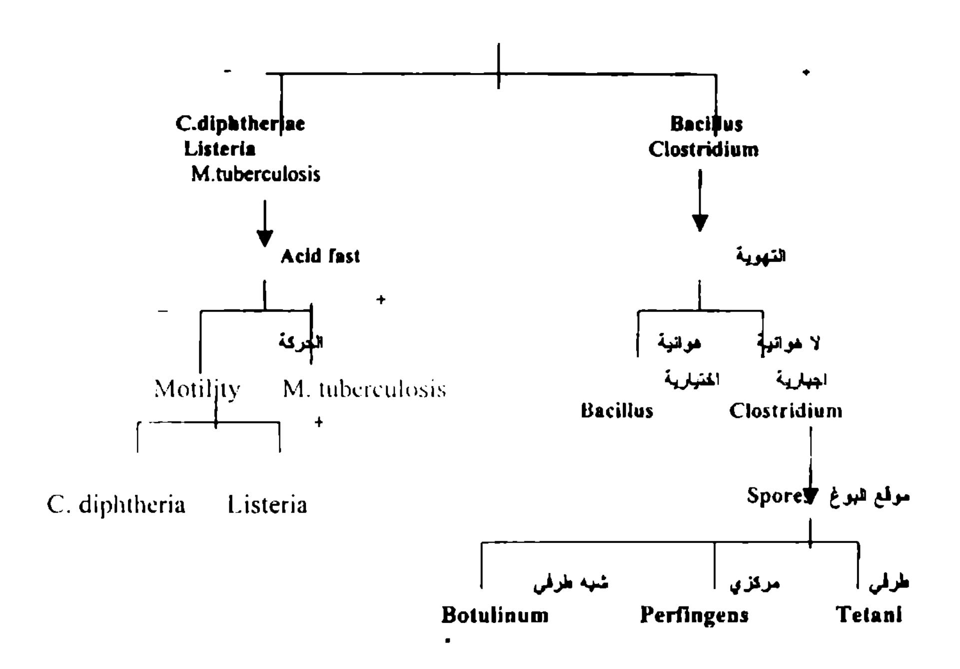
الملحق (4)

مخطط للتفريق بين أهم أنواع العصويات السالبة لصبغة غرام G-ve Rods



ملحق (5)

مخطط للتفريق بين أنواع البكتيريا العصوية الموجبة لصبغة غرام G+ve Bacilli لتكون الأبواغ Spores (بواسطة صبغ الأبواغ)



ملحق (6)

المناطق الجسمية المعقمة وغير المعقمة (المحتوية على ســاكن طبيعــي Normal Flora) في الوضع الطبيعي:

مناطق الجسـم المعقمة أصلاً Steril	مناطق الجسم غير المعقمة
- الدم . - السـائل النخاعى الشوكى CSF. - الأنسجة تحت الجلد Sub Custanous Tissue - الأعضاء الداخلية مثل: الكبد الكلية القلب	تحتـوي المنـاطق التاليــة في الأشــخاص السـليمين على عدد قليل مــن البكتيريـا المرضة (Normal flora) - القناة التنفسية - القناة الهضمية - الجلد - الأذن - العين - القناة التناسلية البولية

ملحق (7)

جدول يوضح الأوساط الزراعية والفحوصات المخبرية اللازمة لكل عينة مرضية

		الاوساط الزراعية المستخدمة: الروتينية	الاوساط الزراعية المستخدمة: الخاصة	الفحوصات المخبرية الاخرى التي تجرى على العينة مباشرة
التهاب الجهاز التنفسي العلوي UpperRTI	_ مسحات swabs من اللوزتين throat و البلعوم الفمي و الفمي _ غسل washing للجيوب الانفية	B.A MacC Choc.A (CO٢ ٥٪)	Bordet – gengou media lofflers agar	مسحات Smear مصبوغة بواسطة _ صبغة غرام_ ازرق المثلين D.Fluorescence Ab
التهابات الجهاز التنفسي السفلي LowerRTI	_ البلغم sputum _سوائل من الحويصلات والقصبات الهوائية bronchoalveorlar fluid _ السائل حول الرئة pleural fluid _الدم	B.A MacC Choc . A	L. J.media SDA	_تحضير رطب Wet mount _مسحات Smear مصبوغة بواسطة صبغة غرام صبغة Acid Faststion
التهابات القناة البولية (UTI)	–البول	B.A MacC CLED	SDA Thio Choc	–تحضير رطب Wet mount –مسحات مصبوغة بواسطة صبغة غرام –تقنية الحقل المظلم Dark Field Tech.
التهابات القناة التناسلية (GTI)	–افرازات الرحم و الاحليل والبروستات –البــول	B.A MacC Choc.A	SDA Thio	–تحضير رطب Wet mount –مسحة مصبوغة بواسطة صبغة غرام –تقنية الحقل المظلم Dark Field Tech.

الهابات الأمعاء Gastrolntritis	-البراز Stool -مسحات من المستقيم -خزعة (Biopsy) من الامعاء - دم (الحمى المعوية)	S.MacC B.A Saliite broth S-Sagar	HK XLD TCBS Campy BAP (٤٢مْ)	التحضير الرطب Wet mount
جرثم الدم Bacteremia والتهاب شغاف القلب Endocarditis والحمى غير معروفة السبب Unexplaind Fever	-زراعة الدم Blood Cultur -عينات من البول أو الجروح أو اي مكان يعتقد أنه أساس في جرثم الدم مثل الأذن والجهاز التنفسي العلوي و CSF	عبوات زراعة الدم الخاصة B.A MacC. Thio. Choc.A (CO۲ ٪٥)	Brucella agar L.J media	مسحات مصبوغة بواسطة صبغة غرام ثقبة الحقل المظلم .
التهابات السحايا Meningitis	-الدم CSF	Choc.A (CO ۲ ٪٥) B.A	MacC. SDA	-عد كريات الدم البيضاء -مسحات مصبوغة بواسطة صبغة غرام أزرق المثلين الاكردين Acridin orang والحبر الهندي Indin Ink -الفحوصات الكيميائية - CSF Latex
التهابات سوائل الجسم Body Fluid infection	سوائل المفاصل أو المحيطة بالقلب أو الرئتين .	B.A MacC. Choc (CO۲ ٪٥)	L.J.media Thio	تحضير رطب W.M. تحضير مسحة مصبوغة بصبغة غرام
التهابات العيون Eye Infection	-مسحة من ملتحمة أو الرازات العين -كشطات Scraping من مكان الالتهاب (الملتحمة) -سوائل من العين الداخلية	B.A Choc.A (CO۲ ٪٥)	SDA Thio	مسحات Smear مصبوغة بصبغة غرام وبصبغة جمسا Giemsa
الجروح والحروق	-مسحات من مكان الالتهاب (PUS) سحب القيح (PUS) من الجروح العميقة	B.A MacC.	Thio SDA	-تحضير رطب -صبغة غرام

			Choc.A (CO_2 5%)	
Ear Infection التهابات الأذن	مسحات من الإفرازات الأذن الخارجية سوائل الأذن الداخلية	B.A MacC. Choc.A(CO_2 5%)	Thio SDA	محضر رطب صبغة غرام

تفسير بعض الاختصارات الموجودة في الجدول السابق :

B.A :Blood Agar
MacC :MacConkey Agar
Choc .A :Chocolate Agar
SDA :Saburaud Dextrose Agar
L.J media :Lewenstein –Jensen media
Thio :Thioglycollate broth
Hk : Hekton enteric agar
Campy BAP : Campylobacter media

المراجع

المراجع العربية:

1- الأحياء الدقيقة، د. نجم الدين الشرابي وزميله، جامعة دمشق/ سوريا 1980.

2- أساسيات علم الأحياء الدقيقة، ابراهيم الطيار وزميله، دار الكندي / اربد 2001

3- مدخل إلى علم الأحياء الدقيقة، ترجمة د.خضر داوود سليمان وآخرون جامعة الموصل / العراق 1984

4- تجارب مختارة في الأحياء المجهرية، أمين عبد الجبار وزميله، جامعة البصرة / العراق 1987 .

5- الأحياء المجهرية الطبية، د مهدي السماك الهيئة العامة للتعليم والتدريب الصحي / العراق i983

6- الكتاب العلمي في أساسيات علم البكتيريا، د.هديل توفيق الحديثي جامعة البصرة / العراق 1983

7- علم الطفيليات الطبي، ابراهيم علي الطيار وآخرون دار الكندي / اربد 2002.

المراجع الأجنبية :

1-Bailey and scotts
Diagnostic Microbiology
Sydney M.Finegald,William J.Martin
6 th Ed 1982 mosby USA

2-Specimen collection and transport For Microbiological investigation
WHO 1995

3-Jawetz,Melnick and adelbergs
Medical Microbiology
20 th Ed 1995

4-Gabriel Virella
Microbiology and infectious diseases
3 rd Ed 1991 MASS Co.EGYPT

5-Davise H.Larone
Medically important Fungi
USA wasington .D.C 1987

6-Elmer W.K.,stephen D.A.,William M.J
color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology
4th Ed philadelphia 1992

7-Beverly price Gobet
Diagnostic Microbiology (Lab .Mannal)
1998 USA

8- Stokes E.Jaon
Clinical Microbilogy
6 th Ed 1987 Lonon

9- Miller,J.Michael
aguide to specimen management in clinical Microbiology
1996 USA

10- John crocker , Daivd Burnett
The science of Laboratory Diagnosis
1998 oxford UK
11- Kathleen D.pagana ,Timothy J.Pagana
Manual of Diagnostic and Labortory Test
1998 mosby .Londan
12- MacFarlanc Twallace
Clinical oral Microbiology
1989 London .
13- Saull Neidlemas ,Allen I.Jaskin
Advances in Applied Microbiology
USA 1997 .
14-Monica cheebrough
Medical Lab .Manual For Tropical countries
Fakenham co. Uk 1993 .
15-Delaat ,Adrian MC
Microbiology For the allied health Professions
USA 1984.
16-Jeam J.L.,Karen M.R.
Clinical Labortory Science
4^{th} Ed Mosby ,Inc 1999.
17- Maurice King
Amedical Lab .For Developing Countries
Fletcher and son Ltd –UK 1984.
18-Monica cheesbrough ,John Mcarthur
Alab .Manual For Rural Tropical Hospitals
Longman G.Ltd london 1980.
19-Manual of basic techniques for ahealth laboratory
WHO 1980 .